



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

“Determinación del receptor para IL-2, así como el efecto de IL-2 sobre la proliferación y regulación de genes mitocondriales (citocromo c) en la línea celular de cáncer cervico uterino C33”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
BIÓLOGO

PRESENTA:

CARLOS HERRERA MIRANDA

DIRECTORA DE TESIS:

M en C. ROSALVA RANGEL CORONA

México, D.F.

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Oncología Celular de la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer Lab-4 P.B., de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental UMIEZ de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM; bajo la dirección de la M. en C. Rosalva Rangel Corona.

Durante la realización del presente trabajo se contó con el apoyo financiero del Programa PAPIME de la DGAPA, UNAM. Proyectos PE-208910 y PE-213312

La dedico:

A mis papás, las personas que más admiro y respeto. Que con su carácter, fortaleza y dedicación han sido mi ejemplo de vida. Gracias por apoyarme, pero sobre todo, por tanto amor que me han dado. LOS AMO.

A mi hermana Karla Alejandra, por estar siempre a mi lado, por apoyarme y por ser la mejor hermana del mundo. Te quiero

A Nalleli Yetzi mi novia y futura esposa. Gracias por comprenderme y apoyarme, por todo tu amor y por compartir tu vida a mi lado. TE AMO

A mi monstrito Vany, con esa risa que ilumina todo.

Agradecimientos

Agradezco a la M. en C. Rosalva Rangel Corona por la paciencia y el tiempo dedicado a mis preguntas e inquietudes y por sus enseñanzas dentro y fuera del laboratorio.

Al biólogo José Misael por toda su atención, porque siempre estuvo dispuesto a responder todas mis preguntas y a aclarar todas mis dudas.

A mis asesores, el biólogo Carlos Martínez M, al M. C. Raúl Zavala C. y a la Bióloga Reyna Roldan Pérez.

Gracias al programa PAPIME de la DGAPA por la beca brindada.

ABREVIATURAS

- ADN: Ácido desoxirribonucleico.
- ADNc: ADN complementario.
- Apaf-1: Factor activador de apoptosis-1, homólogo de la proteína CED-4 del *Caenorhadbitis elegans*.
- APOPTOSOMA: complejo oligomérico formado por Apaf-1, citocromo c y procaspasa 9.
- ARN: Ácido ribonucleico.
- ARNm: ARN mensajero.
- ATP: Adenosín trifosfato.
- Bax: Miembro proapoptótico de la familia Bcl-2
- Bid: Dominio de muerte para la interacción BH3.
- CaCU: Cáncer Cérvico-Uterino
- CAD: ADNasa activada por caspasas.
- CASPASAS: Cisteína proteasas específicas de aspartato. Enzimas proteolíticas que contienen cisteína en su molécula y realizan la proteólisis en lugares previos a aspartato.
- CDK: Ciclina dependiente de cinasas.
- dATP: Desoxiadenosín trifosfato.
- DISC: complejo de señalización inductor de muerte.
- FAS: CD95/APO-1. Miembro de la superfamilia de receptores de muerte del TNF.
- FASL: Ligando del receptor de la muerte FAS.
- GH: Hormona del crecimiento.
- IL-2: Interleucina 2.
- IL-2R: Receptor de IL-2.
- INF: Interferón.

- LSP: Linfocitos de Sangre Periférica.
- PB: Pares de bases.
- PBS: Amortiguador salino de fosfatos.
- PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa.
- RT: Retrotranscripción.
- TNF: Factor de necrosis tumoral.

INDICE

| | |
|---|----|
| 1. RESUMEN..... | 9 |
| 2. INTRODUCCION..... | 11 |
| 3. MARCO TEORICO..... | 13 |
| 3.1 Cáncer..... | 13 |
| 3.2 Cáncer Cérvico-Uterino..... | 15 |
| 3.3 Citocinas..... | 17 |
| 3.3.1 Interleucina-2..... | 17 |
| 3.3.2 Receptor de IL-2..... | 19 |
| 3.3.3 Afinidad de IL-2 a su receptor..... | 21 |
| 3.3.4 Efecto de IL-2 en células tumorales..... | 25 |
| 3.4 Ciclo celular..... | 26 |
| 3.5 Apoptosis..... | 29 |
| 4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA..... | 34 |
| 5. JUSTIFICACIÓN..... | 35 |
| 8. HIPOTESIS..... | 36 |
| 7. OBJETIVOS..... | 37 |
| 7.1 Objetivo general..... | 37 |
| 7.2 Objetivos particulares..... | 37 |
| 8. MÉTODO..... | 38 |
| 8.1 Material Biológico..... | 38 |
| 8.2 Condiciones de cultivo..... | 38 |
| 8.3 Evaluación de la proliferación de las células tumoral en presencia de IL-2..... | 38 |
| 8.4 Ensayo de ELISA para determinar el RIL-2..... | 39 |
| 8.5 Extracción de ARNm..... | 39 |
| 8.5.1 Retrotranscripción del ARNm..... | 40 |

| | |
|--|----|
| 8.6 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)..... | 40 |
| 8.6.1 Electroforesis de los productos de PCR..... | 41 |
| 9. RESULTADOS..... | 42 |
| 9.1 Evaluación de la proliferación de la línea celular de CaCU C-33A estimuladas con IL- 2..... | 42 |
| 9.2 Determinación de la presencia de las cadenas α , β y γ del receptor para IL-2 en la línea celular C33 por medio de la técnica de ELISA. | 43 |
| 9.3 Expresión de β -actina en la línea celular de CaCU..... | 45 |
| 9.4 Expresión de la cadena α del RIL-2 en la línea celular C33-A..... | 46 |
| 9.5 Expresión de la cadena β del RIL-2 en la línea celular C33-A..... | 47 |
| 9.6 Expresión de la cadena γ del RIL-2 en la línea celular C33-A..... | 48 |
| 9.7 Expresión de Citocromo c en la línea celular C33-A..... | 49 |
| 10. DISCUSIÓN..... | 51 |
| 11. CONCLUSIONES..... | 56 |
| 12. BIBLIOGRAFIA..... | 57 |
| 13. ANEXOS..... | 66 |

1. RESUMEN

El Cáncer Cérvico-Uterino (CaCU) representa un grave problema de salud mundial, tan solo en México de acuerdo a la Organización Mundial de la salud es la segunda causa de mortalidad por cáncer en mujeres teniendo un 12.9% de mortalidad lo que representa alrededor de 5000 muertes al año.

A lo largo de las dos últimas décadas se ha empleado la inmunoterapia como terapia para este tipo de enfermedad ya que representan una alternativa en contra del cáncer. En particular nuestro grupo de trabajo se ha especializado en el uso de IL-2 recombinante que estimula células NK y linfocitos T para inducir una respuesta citotóxica de rechazo tumoral.

Al respecto el Laboratorio de Oncología Celular de la FES-Z ha reportado la presencia de las tres cadenas α , β y γ del RIL-2 en líneas celulares de CaCU, CALO e INBL, positivas al Virus del Papiloma Humano 18, también se ha comprobado que IL-2 tiene un efecto dual en estas células, de acuerdo a su concentración; en dosis bajas 10 UI/mL hay un aumento en la proliferación celular y en altas dosis 100 UI/mL presentan un efecto antiproliferativo. Sin embargo, no se sabe si la respuesta ante la presencia de IL-2, así como, la expresión del RIL-2 está directamente relacionada con la inserción del VPH. Dado que la línea celular de CaCU C-33A es negativo a VPH se decidió detectar la presencia del receptor de IL-2 en esta línea celular y determinar si existe un efecto antiproliferativo en presencia de esta citocina; evaluando si esta actividad antiproliferativa regula genes para citocromo c.

Nuestros resultados muestran que la línea celular de CaCU C-33A no responde de manera diferencial a distintas concentraciones de IL-2 exógena ya que tanto a altas como bajas concentraciones no modifica su proliferación con respecto al control. También, se demostró la no presencia de las cadenas del RIL-2 en la línea celular C-33A. Por último, en presencia de IL-2 no observamos regulación de la expresión del mensajero para citocromo c, ya que tanto en las células cultivadas en ausencia como en presencia de IL-2 no se observa cambio en el producto de amplificación para esta proteína.

Con estos resultados podemos concluir que en células no infectadas con VPH no existe la síntesis de las cadenas β y γ , del RIL-2 a través de las cuales IL-2 lleva a cabo la transducción de señales, por lo cual IL-2 no muestra ningún efecto sobre la proliferación de la línea C33-A y por lo tanto no se puede inducir muerte por IL-2.

2. INTRODUCCIÓN

Para cada estirpe celular, el control del número de células es el resultado de un balance dinámico entre la proliferación y la muerte. La muerte celular es necesaria para mantener el equilibrio entre las poblaciones celulares de los tejidos y puede darse de dos formas, por necrosis o por un tipo de muerte celular programada llamado apoptosis.

La apoptosis requiere de la activación de genes específicos para que se lleve a cabo y por esto se le da el nombre de muerte celular programada, ésta, es una muerte fisiológica y se presenta porque el organismo requiere, para su desarrollo, la muerte particular de algunas células por lo tanto, la apoptosis, es crucial en la remodelación de tejidos y se produce durante las diferentes etapas de desarrollo del organismo, sin embargo cuando estos procesos se ven alterados tienen un papel muy importante en el desarrollo de enfermedades degenerativas, como lo es el Cáncer Cérvico-Uterino (CaCU).

El CaCU es la segunda causa de muerte por neoplasias en mujeres de México y actualmente es aceptado que la infección por Virus de Papiloma Humano de alto poder oncogénico (VPH) es el principal factor asociado al desarrollo de esta neoplasia. A nivel molecular, en el CaCU como en cualquier otra neoplasia, se presenta una complejidad de alteraciones genómicas en pérdidas y ganancias de material genético. Las oncoproteínas E6 y E7 de VPH interactúan con p53 y pRb respectivamente para inducir la transformación e inmortalización celular. Sin embargo, la línea celular C-33A proveniente de CaCU se desarrolló en ausencia de algún tipo de VPH (Yee, 1985), la transformación se asocia a una mutación en pRb y p53. En el caso de pRb las mutaciones afectan el nivel de fosforilación de esta, provocando que pierda su función de acoplarse y retener a E2F, por lo que al estar libre puede activar genes de G1 provocando que el ciclo celular continúe, esta inactivación de pRb ha sido observada en una variedad de cánceres. En el caso de p53 la mutación induce que se eleven los niveles de este gen aumentando su vida media y por lo tanto provoca una mayor proliferación celular (Scheffner, 1991).

En la actualidad se han desarrollado diferentes áreas de investigación en torno al CaCU siendo una de ellas el estudio de la proteína IL-2 como alternativa terapéutica, al igual que se ha determinado la presencia del receptor para IL-2 (RIL-2) en las líneas de CaCU CALO e INBL. Dichos trabajos previos nos dan las bases para sustentar el presente trabajo, ya que poco se sabe sobre los procesos moleculares que están siendo regulados por IL-2, es por ello que la línea de investigación a seguir es profundizar en la intervención de los genes involucrados en el proceso apoptótico.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Cáncer

El Cáncer es un proceso de múltiples pasos durante los cuales las células tendrán profundos cambios tanto metabólicos como fisiológicos (Figura 1), estos cambios surgirán a través de la acumulación de modificaciones en los programas genéticos (Merlo *et al*, 2006), dichas modificaciones incluyen seis funciones biológicas adquiridas durante el desarrollo del cáncer: controlan la señalización proliferativa, insensibilidad a las señales anticrecimiento, resistencia a la muerte celular, lo que permite la mortalidad replicativa, la inducción a la angiogénesis, adquieren la capacidad de escapar al sistema inmune y por último invadir tejidos distantes para formar metástasis. Además de estos rasgos distintivos, es la inestabilidad del genoma, lo que genera la diversidad genética, la cual aumenta los rasgos distintivos del cáncer (Hanahan *et al*, 2011)

Estos procesos darán como resultado la formación de una masa anormal que se le conoce como tumor o neoplásia. Los tumores pueden ser clasificados como benignos o malignos. Los tumores benignos representan menos riesgo para el paciente, ya que suelen ser de crecimiento lento y una vez extirpados no vuelven a crecer nuevamente; los tumores malignos son pequeñas lesiones que cuando son detectadas en un estadio temprano pueden ser removidos completamente sin causar la muerte del paciente (Juliet, 2007). Sin embargo, cuando no son detectados en un estadio temprano, los tumores se desarrollan y crecen, adquiriendo la capacidad de perturbar e interferir con las células vecinas. Estos tumores no permanecerán más en sus tejido de origen y se diseminaran dentro del órgano afectado y posteriormente se esparcirán a los órganos vecinos por lo tanto, estos tumores son más difíciles de tratar provocando la muerte de los pacientes (Boyle y Levan, 2008)

El cáncer inicia con pequeños cambios, tales cambios no importando el tamaño son llamados “alteraciones genéticas” o “mutaciones” las cuales ocurren en la secuencias de ADN. Los cambios genéticos son la piedra angular del cáncer (Herceg y Hainaut, 2007). Las células cancerígenas acumulan mutaciones en un grado significativamente más alto que las células normales, una propiedad referida como “Genotipo Mutador”. Esta

propiedad de transformar a las células es esencial para el desarrollo del cáncer, así como para desarrollar una resistencia a los tratamientos contra el cáncer (Loeb *et al*, 2008). El Fenotipo mutado es la consecuencia de mutaciones en genes que normalmente controlan la integridad y la reparación del ADN. Los mecanismos moleculares que se ven afectados por el Genotipo Mutado son: defectos en la reparación del ADN, transcripción de los genes, control del ciclo celular y muerte celular (Boyle y Levan, 2008).

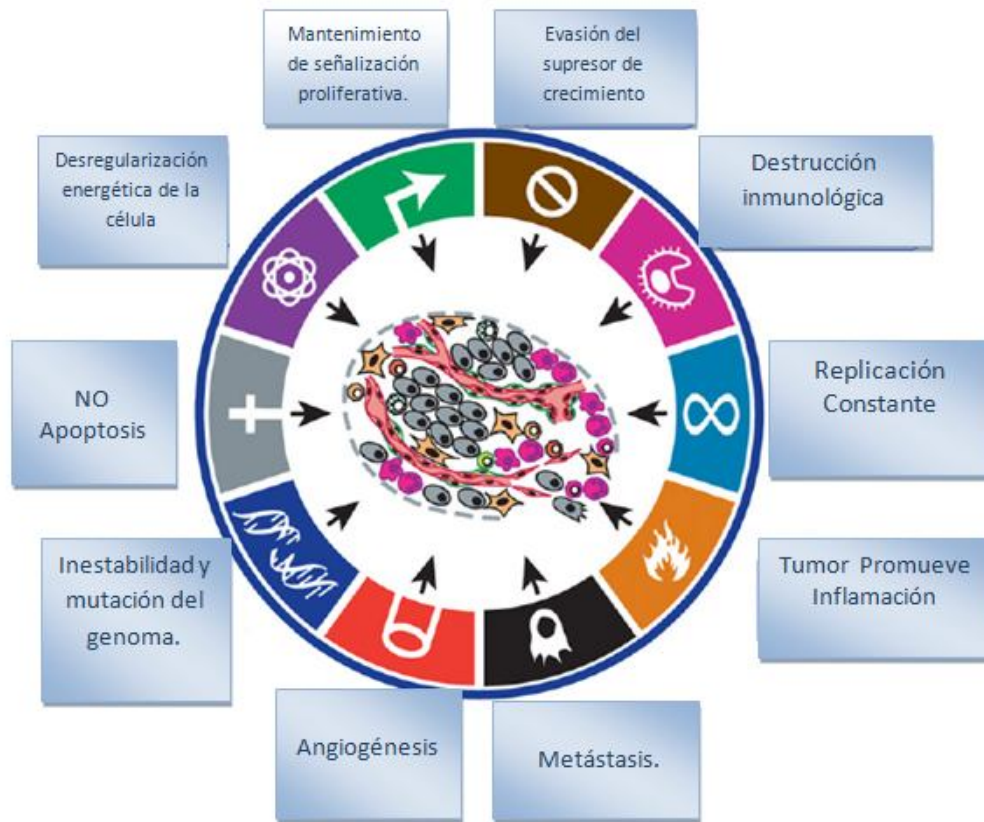


Figura 1.- Todas las células poseen una maquinaria que regula la proliferación, diferenciación y muerte, la figura muestra las diez características del cáncer. (Tomado de Hanahan, 2011)

Detectar las mutaciones en las células de cáncer podría tener grandes implicaciones en las investigaciones y las terapias. Las mutaciones pueden dar información de la evolución del cáncer y proveer pronósticos clínicos interesantes, detectar estas mutaciones ayudará a un diagnóstico temprano del cáncer, además permitirá el desarrollo de nuevos fármacos que ayudaran a combatir el desarrollo del cáncer.

3.2 Cáncer Cérvico-Uterino

A nivel mundial, el Cáncer Cérvico-Uterino (CaCU) es el tercer cáncer más común por neoplasias malignas en la mujer (parking *et al*, 2008), con un estimado de 530,000 casos nuevos por año y una mortalidad del 52 % lo que representa 275,000 muertes por año, más del 85% de los casos corresponden a países en desarrollo y representa el 13 % de todos los cánceres femeninos (Ferlay *et al*, 2008).

En México de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud es la segunda causa de mortalidad por cáncer en mujeres, teniendo un 12.9 % de mortalidad, lo que representa alrededor de 5000 muertes al año y ocupa el 15.5 % de incidencia en mujeres con respecto a los demás cánceres (Ferlay *et al*, 2008).

El CaCU surge en el epitelio que cubre el cuello del útero, particularmente en la unión entre el epitelio columnar del endocérvix y el epitelio escamoso del ectocérvix. Es un sitio de continuos cambios metaplásicos, más activos en la pubertad y durante el primer embarazo y declinan después de la menopausia (López y Lizano, 2006). Infecciones persistentes del epitelio cervical con uno o más tipos oncogénicos del Virus del Papiloma Humano (VPH) provocaran el desarrollo de lesiones precancerosas, las cuales si no son detectadas y tratadas, progresaran en un cáncer cervical invasivo en un periodo de 10 a 20 años. Carcinomas escamosos son los tipos más comunes de tumores epiteliales del cérvix y representan el 90% de los cánceres epiteliales. Adenocarcinomas y canceres adenoescamosos, entre otros, constituyen el restante 10 % (Boyle y Smans, 2008).

El principal agente etiológico del CaCU es el VPH, el 99.8 % de los casos de CaCU expresan proteínas virales. Actualmente, se conocen más de 100 tipos de este virus (Bosch *et al*, 2002) y la International Agency for Research on Cancer ha clasificado como carcinogénicos a los tipos de VPH: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, y 66 también, conocidos como virus de alto riesgo para el desarrollo del cáncer de cérvix (IARC, 2007). Sin embargo, aunque muchas anormalidades del cérvix causadas por la infección del VPH, son improbables que progresen a NIC de alto grado o cáncer de cérvix, es por eso, que pueden ser necesarios factores exógenos y endógenos que

actúen en conjunto con el VPH para la progresión de la enfermedad (Bosch *et al*, 2002).

Estudios epidemiológicos han identificado otros factores de riesgo que contribuyen al desarrollo del CaCU. Estos incluyen relaciones sexuales a una temprana edad, tener múltiples parejas sexuales, multiparidad, uso prolongado de anticonceptivos hormonales, antecedentes heredo-familiares, el tabaquismo y el alcoholismo (Bosch *et al*, 2002; Munoz *et al*. 2003; López y Lizano, 2006). La apreciación del papel de estos cofactores debe tomar en cuenta el central y fuerte efecto del VPH (IARC, 2007), ya que, actuaran en conjunto con el VPH provocando que el epitelio columnar del cuello uterino sea remplazado por epitelio escamoso metaplásico. El área del epitelio cervical donde esta metaplasia escamosa ocurre es llamada zona de transformación y es aquí donde la neoplasia cervical ocurre (Walboomers, 1999).

La maduración y diferenciación del epitelio escamoso metaplásico es el resultado de la expresión de las oncoproteínas E6 y E7 de VPH que interactúan con p53 y pRb respectivamente para inducir la transformación e inmortalización celular, además E6 y E7 tienen propiedades de transregulación de genes celulares independiente de su asociación con p53 y pRb que también, contribuyen al avance del proceso neoplásico (Rocha, 2004; Bañuelos, 2003), provocando la aparición, persistencia y progresión de lesiones precancerosas tales como las Neoplasias Cervicales Intraepiteliales (NICs) con diferentes grados dependiendo del espesor del epitelio afectado por las células displásicas. En NIC 1 que se caracteriza por tener mayor actividad mitótica y contenido de células inmaduras en el tercio inferior del epitelio; en NIC 2 las tres cuartas partes profundas del epitelio tiene células inmaduras, solo las capas superficiales experimentan un esbozo de maduración y en ellas se aprecian células aplanadas; y en NIC 3 las verdaderas precursoras del CaCU se caracterizan por presentar mayor actividad mitótica y contenido de células inmaduras en los tercios central y superior (Ramírez, 1997; Dzul, 2004; López y Lizano, 2006).

La detección temprana y el tratamiento oportuno del VPH en lesiones precancerosas pueden prevenir la progresión del cáncer. Los métodos principales de diagnósticos han sido la histopatología y métodos citológicos. Recientemente se han introducido los

métodos moleculares para detectar VPH en muestras clínicas. A lo largo de las dos últimas décadas, grupos de investigación han administrado tratamientos con diversas proteínas y citocinas que tienen como objetivo aumentar la respuesta inmunológica del paciente, entre ellas podemos mencionar a los interferones e interleucinas.

3.3 Citocinas

Muchos de los eventos de la respuesta inmune están regulados por moléculas solubles llamadas citocinas, se conocen alrededor de 20 tipos y cada una presenta una función definida. Cada citocina es producida por más de un tipo celular y cada célula es capaz de producir diversos tipos de citocinas, en una forma regulada. Las citocinas presentan diversos mecanismos de acción a través de los cuales es probable que puedan provocar el rechazo de tumores, ya sea actuando directamente contra la célula tumoral o aumentando la expresión de antígenos (Guzmán, 2004). Las citocinas son importantes en la regulación de la proliferación y diferenciación celular y en la activación de células de la respuesta inmune. Éstas se secretan en respuesta a una amplia variedad de estímulos como el estrés celular, lesiones inducidas por carcinógenos e infecciones o inflamación (Bermúdez *et al*, 2005). Las citocinas también son mensajeros químicos u hormonas extremadamente potentes a pesar de que actúan a concentraciones muy bajas son muy específicas, actuando sobre la célula blanco gracias a su afinidad por los receptores de membrana (Aguzzi, 2005).

La activación de las células T en reposo por un antígeno a través de receptores específicos, provoca que se inicie una compleja secuencia de traducción de señales que conducen finalmente a respuestas celulares como la proliferación y diferenciación (Smith K, 1989). Después, de la estimulación antigénica una serie de importantes genes para la activación de las células T son expresados coordinadamente. Entre estos genes se encuentra interleucina 2 (IL-2) (Figura 2) y los receptores de IL-2 (RIL-2).

3.3.1 Interleucina-2 (IL-2)

IL-2 es una proteína descubierta en 1976 en los laboratorios del National Cancer Institute. Se descubrió como un “Factor de crecimiento de células T” (Morgan *et al*,

1976). IL-2 humana es una proteína monomérica de 15.5 kDa, con 133 aa y con punto isoeléctrico entre 6.6 y 8.2. Es una molécula hidrofóbica la cual es estable en pH bajo; la proteína madura contiene tres residuos de cisteína, dos de los cuales forman una unión disulfuro que es requerida para la actividad biológica (Mire, 1998; VanderSpek, 1996).

IL-2 estimula la secreción de otras citocinas entre las que se incluye el interferón γ y sustancias con actividad biológica que pueden mediar efectos secundarios. Esta citocina es una proteína muy importante en la respuesta inmunológica mediada por células al promover la activación y proliferación de los Linfocitos T; cambia la proliferación de linfocitos granulares y también facilita la destrucción de tumores por activación de macrófagos, NK y células asesinas activadas por linfocinas e incrementa la producción de anticuerpos en células B (Coventry *et al* 1996; Boni, 2001). Sin embargo, bajo ciertas circunstancias IL-2 puede promover la muerte de los linfocitos T en respuesta a su activación, lo que implica que un mecanismo regulatorio negativo tiene un papel importante manteniendo el balance entre el aumento y la eliminación de los clones de linfocitos en respuesta a un estímulo antigénico.

Para comprender los mecanismos moleculares de acción de IL-2, se llevaron a cabo una serie de experimentos donde se demostró que IL-2 se une a receptores de alta afinidad en células T activadas. También se observó que los receptores de baja afinidad son expresados en células T, mientras que receptores de afinidad intermedia fueron expresados en linfocitos de reposo (Waldmann, 1989).

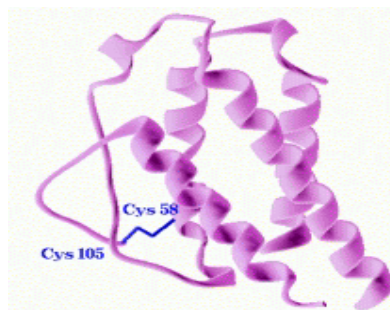


Figura 2.- Modelo esquemático de IL-2. Las alfa hélices están representados como cilindros y están marcados secuencialmente por los amino ácidos terminales (Tomado de Arkin, 2003).

3.3.2 Receptor de IL-2

La interacción de IL-2 con su receptor (RIL-2) controla la magnitud y duración de la respuesta inmune desencadenando varias señales intracelulares. El RIL-2 es un complejo proteico formado por tres subunidades o cadenas: la cadena α (RIL-2 α), la cadena β (RIL-2 β) y la cadena γ (RIL-2 γ_c); las cuales se expresan unidas no covalentemente en la superficie de linfocitos T, B, NK, macrófagos y monocitos (Minami *et al*, 1993).

Cadena α del receptor de IL-2 (RIL-2 α)

El desarrollo de un anticuerpo monoclonal, anti-Tac, dirigido al receptor de IL-2 permitió la purificación y clonación del primer receptor de IL-2, la cadena α (RIL-2 α). Su secuencia de aminoácidos reveló que RIL-2 α tiene 219 aa en el dominio extracelular. Este dominio contiene dos sitios potenciales de glicosilación de unión N, 19 aa en la región transmembranal y solo 13 aa en el dominio citoplasmático positivamente cargados (cinco argininas y una lisina), que tienen una función de anclaje (Leonard *et al*, 1984). El RIL-2 α humano es un gene localizado en el cromosoma 10p14-15 y tiene seis exones y siete intrones (Leonard *et al*, 1985) la estructura primaria de RIL-2 α no muestra una secuencia homologa importante con otras moléculas de receptores conocidos y no pertenece a la superfamilia de receptores de citocinas. RIL-2 α es inducido por antígenos (y activación celular con antiCD3 o antiCD28 mas antiCD3), mitógenos, por la proteína Tax, por la proteína activadora de la cinasa C, por la proteína activadora de la cinasa A y por ciertas citocinas incluyendo IL-1, TNF α e IL-2 (Kawahara, 1994).

Cuando se observó que RIL-2 α es expresado en células no linfoides, y éste se une a IL-2 con una afinidad baja, indico la existencia de otras proteínas de unión a IL-2 necesarias para la formación de complejos receptores de intermedia y alta afinidad.

Cadena β del receptor de IL-2 (RIL-2 β)

Experimentos posteriores revelaron la existencia de una proteína en el complejo receptor-ligando de 70-75 kDa, esta proteína es el segundo receptor para IL-2, la cadena β (RIL-2 β) (Teshigawara, 1987). El desarrollo de anticuerpos monoclonales para RIL-2 β , Mik β 1 y Mik β 2, permitieron la expresión de esta subunidad. La proteína RIL-2 β contiene 525 aa que forman la proteína madura de RIL-2 β , 214 aa en el dominio extracelular, 25 aa en la región transmembranal, y 286 aa en la región citoplasmática. RIL-2 β es rápidamente fosforilado después de la estimulación de IL-2 indicando que la región citoplasmática de RIL-2 β tiene un papel importante en la transducción de señales de IL-2 (Tsuda *et al*, 1989). El RIL-2 β humano está localizado en el cromosoma 22q11.2-12 y está organizado en diez exones y nueve intrones (Gnarra *et al*, 1990).

El RIL-2 β es potencialmente activado por la estimulación de varios mitógenos policlonales, antiCD3, antiCD28 o antiCD28 mas antiCD2 y por citocinas incluyendo IL-4 e IL-2 (Casey *et al*, 1992).

Interesantemente aunque ciertas células contienen RIL-2 β pero no RIL-2 α , estas células se unen a IL-2 con una afinidad intermedia, sin embargo, la expresión sola de la cadena RIL-2 β falló en reconstituir este receptor. Esta observación sugirió que un componente específico era requerido para la formación funcional de los RIL-2 (Arima *et al*, 1992).

Cadena γ del receptor de IL-2 (RIL-2 γ)

Experimentos posteriores identificaron a una proteína de membrana de 64 kDa en el complejo de receptores la cual, también, interactuaba con IL-2 (Saito Y *et al*, 1991). La purificación y la clonación molecular de este tercer receptor de IL-2 (inicialmente conocido como RIL-2 γ , actualmente como RIL-2 γ c “receptor común de las citocinas”, debido a que también, es compartido por los receptores de IL-4, IL-7, IL-9 e IL-15) fue hecho posible por un anticuerpo monoclonal de RIL-2 β que pudo coprecipitar RIL-2 γ , en presencia de IL-2. RIL-2 γ contiene 232 aa en la región extracelular, 29 aa en la región transmembranal y 86 aa en el dominio citoplasmático (Takeshita *et al*, 1992). El

gene del RIL-2 γ humano está localizado en el cromosoma X y está organizado en ocho exones y siete intrones, y es regulada por IL-2 o IFN γ (Bosco *et al*, 1994).

3.3.3 Afinidad de IL-2 a su receptor

El receptor de baja afinidad está compuesto por la cadena α , el receptor de afinidad intermedia está compuesto por las cadenas β y γ , y el receptor de alta afinidad está compuesto por las tres subunidades (Figura 3) (Nelson *et al*, 1994).

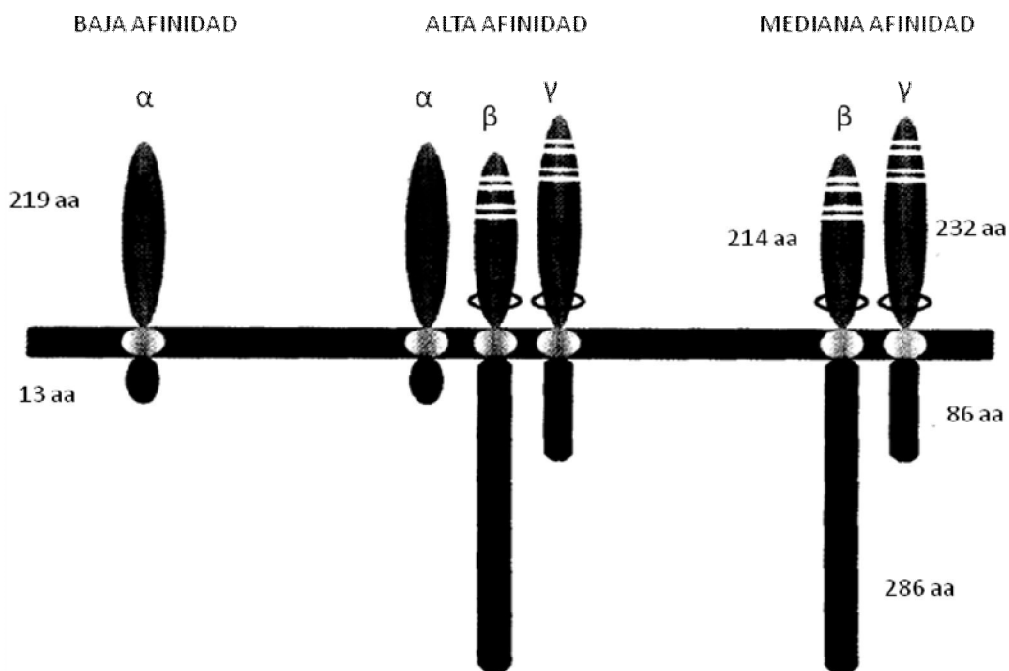


Fig.3.- Esquema de las tres clases de receptores para IL-2. Baja afinidad formada por la cadena α , alta afinidad formada por la cadena α , β , y γ , la afinidad intermedia formada por la cadena β y γ (Tomado de Jian-Xin *et al*, 1997).

De acuerdo a esta información, fue concluido que distintas áreas de la molécula de IL-2 se unen a cada uno de los tres receptores. Además fue demostrado que la cadena α no participa en la señalización, mientras que, tanto la cadena β como γ son necesarias para la señalización (Nelson *et al*, 1994).

RIL-2 α no está expresado en células de reposo, pero es potencialmente inducido después de la activación de las células T. La coexpresión de las cadenas α y β forman

un receptor de alta afinidad en linfocitos, sin embargo, cuando son coexpresados en células no hematopoyéticas forman un receptor de “pseudoalta” afinidad en su unión con IL-2. RIL-2 β y γ están expresados en linfocitos de reposo, explicando la afinidad intermedia de IL-2 cuando se une a estas células, especialmente en células NK (Robb *et al*, 1984).

A pesar de que la reconstitución de los complejos de receptores de IL-2 con afinidad intermedia y alta en células no hematopoyéticas puede dar como resultado la expresión de genes, estos complejos no son suficientes para transducir señales proliferativas en estas células. En consecuencia, aunque las cadenas α , β y γ tienen propiedades de unión de alta afinidad, moléculas adicionales específicas son necesarias para que IL-2 pueda transducir señales proliferativas (Minami *et al*, 1994).

En este sentido, ha sido demostrado que un ligando o un anticuerpo activa interacciones funcionales de la región citoplasmática tanto de RIL-2 β como de RIL-2 γ indicando que estos dos receptores son los únicos que pueden unirse a moléculas de señalización, aunado a esto, la señalización de IL-2 requiere la cooperación funcional entre el dominio citoplasmático de RIL-2 β e RIL-2 γ . El principal rol del ligando es inducir la dimerización del dominio citoplasmático de estos receptores (Kawahara *et al*, 1994).

Basado en sitios convenientes de restricción de enzimas, el dominio citoplasmático de RIL-2 β es dividido en: una región rica en serina, una región ácida y una región rica en prolina (Figura 4). La función principal de la región rica en serina es reclutar a Jak 1, esta región es importante para la transmisión de señales proliferativas, mientras que la función de la región rica en prolina no se basa en lo absoluto en los residuos de prolina, sino que se basa en la presencia de dos tirosinas que son importantes para el acoplamiento y la activación de la proteína STAT (Friedmann *et al*, 1996). Además, de estas dos tirosinas, el RIL-2 β humano tiene otras cuatro tirosinas, las cuales están localizadas en la región ácida, la eliminación de esta región da como resultado la pérdida del potencial de acoplamiento de la fosfotirosina que es esencial para la señalización molecular. El rol principal de RIL-2 β , es conferir a las células la capacidad de proliferar en respuesta a IL-2 (Page *et al*, 1991).

El dominio citoplasmático de RIL-2 γ contiene una región que tiene una homología con el dominio de SH2, sin embargo, esta región es mucho más corta que el dominio de SH2 y carece del residuo conservado de arginina que es necesario para la interacción del dominio de SH2 con los residuos de la tirosina fosforilada (Figura 5) (Takeshita *et al*, 1992). No obstante esta región está conservada en humano y es esencial en la transducción de señales de IL-2. Ya que en ausencia de RIL-2 γ no existe una respuesta a IL-2, además de que se pierden las señales proliferativas (Arima *et al*, 1992).

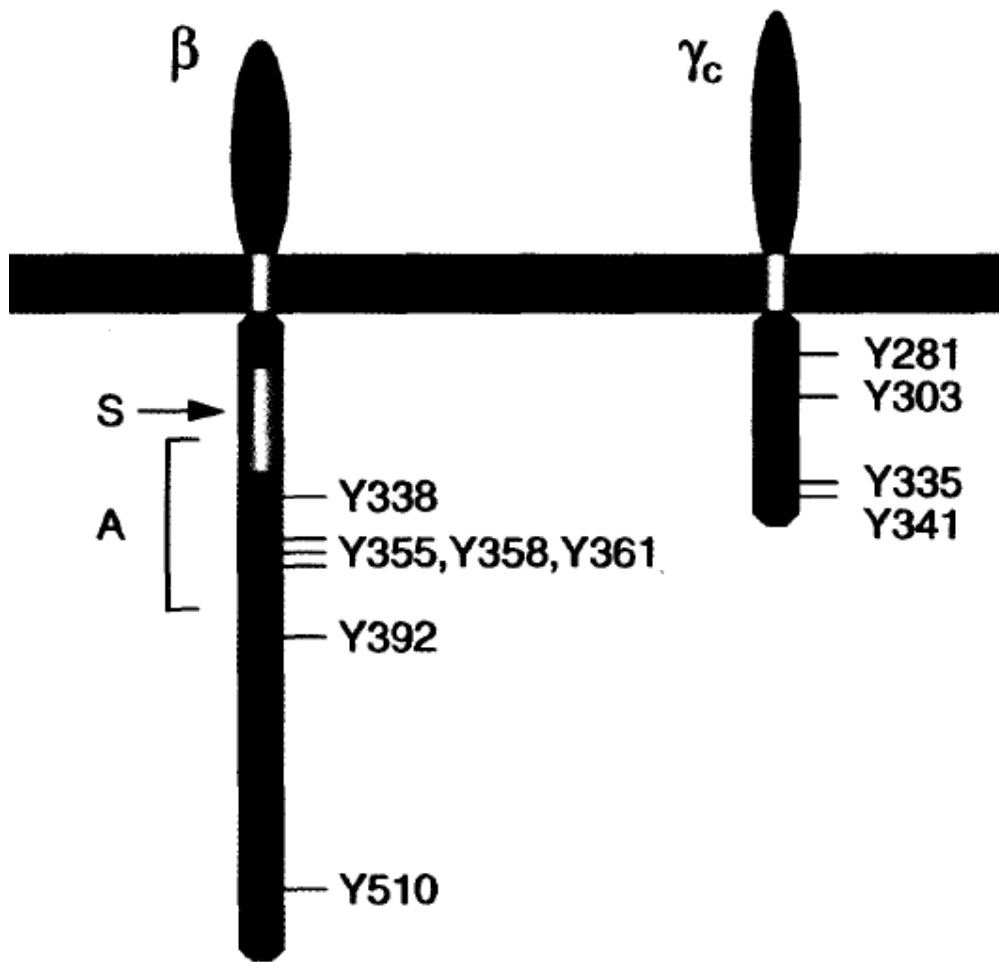


Figura 4.- Ilustración esquemática de RIL-2 β y γ . Para RIL-2 β , la “S” indica la región rica en serina y la “A” indica la región ácida. Los residuos de tirosinas en los dominios citoplasmáticos de RIL-2 β y γ son mostrados. (Tomado de Jian-Xin *et al*, 1997).

Tanto RIL-2 β como RIL-2 γ_c son miembros de la superfamilia de receptores de las citocinas (Figura 5), las cuales incluyen al receptor para GH, prolactina, eritropoyetina (Epo), trombopoyetina y muchas interleucinas. Tiene un factor común, dos pares de

residuos de cisteína conservados cerca de la región amino terminal y un triptófano-serina-X-triptófano-serina (WSXWS, región WS, donde X puede ser cualquier aminoácido) en el dominio extracelular. WS es importante para la unión ligando y la transducción de señales que a su vez son factores para la formación del RIL-2 funcional, además de residuos de cisteínas que participan en la formación de enlaces disulfuro requeridos para unirse a IL-2 (Nelson *et al*, 1994; Kawahara *et al*, 1994).

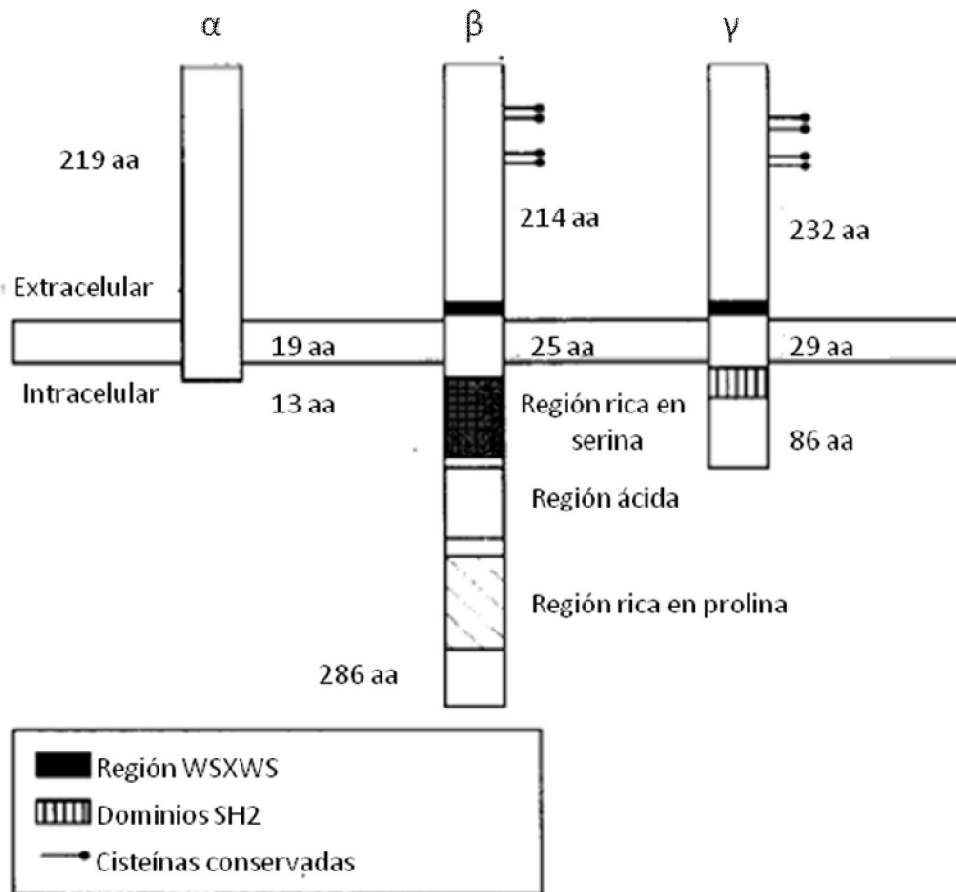


Figura 5.- Las cadenas β y γ son miembros de la superfamilia de receptores de citocinas, con cuatro cisteínas conservadas (dos pares de barras) y una región Trp-Ser-X-Trp-Ser (WSXWS). Los tamaños de los dominios de aminoácidos (aa) citoplasmáticos y extracelulares se muestran para cada cadena. En la región citoplasmática de la cadena β se observan las regiones ricas en serinas, prolina y la región ácida, involucradas en la señal de transducción intracelular. (Tomado de Minami *et al*, 1993)

3.3.4 Efecto de IL-2 en células tumorales

En varios modelos tumorales se ha determinado que las citocinas pueden favorecer la regresión del tumor, al activar la respuesta inmune mediada por células. Las citocinas IL-2, IL-12, IL-18, IFN y el factor estimulador de colonias de granulocitos monocitos (GM-CSF) recombinantes se han utilizado en la inmunoterapia contra el cáncer (Bermúdez *et al*, 2005).

La IL-2 recombinante es una de las citocinas empleadas en la inmunoterapia contra tumores sólidos, dada su capacidad de activar algunos sistemas citotóxicos antitumorales del huésped. La terapia con IL-2 recombinante se inició en 1984, su acción se inicia con la unión de la proteína a su receptor, el cual está presente en células de origen hematopoyético. En la actualidad diversos autores han descrito que el RIL-2 no es exclusivo de este tipo celular, ya que también se expresa en células normales de riñón, células endoteliales de cordón umbilical, queratinocitos, células intestinales, células de origen nervioso y en células de carcinomas humanos, melanoma, mama, colorectal, pulmón, hígado, estómago, renal y en algunas líneas de células linfoides (Romo *et al*, 2009)

Particularmente, el efecto adyuvante de IL-2 se ha probado en modelos tumorales asociados a VPH. Se ha demostrado que el tratamiento con la proteína recombinante y con el gen de IL-2, administrados por vía intratumoral, reduce significativamente el avance de los tumores asociados al VPH e inhibe la formación de tumores recurrentes después de ser eliminados por cirugía (Bermúdez *et al*, 2005).

El grupo de trabajo del Laboratorio de Oncología Celular de la FES-Zaragoza, demostró la presencia de las cadenas α , β y γ del RIL-2 en líneas celulares de CaCU, CALO e INBL (VPH-18), también se comprobó que éste es activado por IL-2 exógena y que presentan una expresión diferencial de acuerdo al estadio del tumor, ya que muestra un patrón de fosforilación de proteínas cinasas diferente al expresado en linfocitos T de donadores sanos y estimula la actividad citotóxica de linfocitos T contra tumores (Rangel *et al*, 1998).

Se ha reportado que dependiendo de la dosis de IL-2 administrada en cultivos de las líneas celulares podemos inhibir la proliferación de las células de CaCU en presencia de 100 UI/ml de IL-2 exógena, sin embargo, en presencia de 10 UI/ml de IL-2 podemos inducir la proliferación de esas mismas células tumorales. Estos datos sugieren la dependencia de las líneas celulares de CALO e INBL por IL-2. Así mismo, se ha evaluado el comportamiento de las líneas celulares de CaCU en presencia de 100 UI/ml de IL-2 y se observa la inhibición de la proliferación celular (Alvarado, 1997; Rangel *et al*, 1998)

Estos resultados hasta ahora obtenidos en nuestro grupo de trabajo indican que IL-2 parece inducir el ARNm para proteínas mitocondriales en las células de carcinoma de cérvix. Las secuencias de estos ARNm aislados guardan un 95 % de homología con citocromo c, que se sabe, es liberado al citosol durante el proceso de apoptosis inducida por la vía intrínseca, por lo que pensamos que IL-2 podría estar regulando esta vía. Es evidente que estos resultados son de gran interés, ya que la activación de genes mitocondriales como el citocromo c, está involucrado en los mecanismos de muerte celular.

3.4 Ciclo celular

La proliferación celular ocurre a través de una serie de etapas que son colectivamente denominadas: ciclo celular. El ciclo celular se refiere al conjunto de procesos celulares y moleculares durante los cuales el material genético es replicado y segregado entre dos nuevas células hijas recién generadas, mediante la vía de mitosis (López-Casillas, 2002). El ciclo celular puede ser dividido en dos momentos de importantes cambios morfológicos y bioquímicos: la fase M o mitosis durante la cual se da la división celular y la fase S o síntesis durante la cual el ADN es replicado. Estas dos fases son separadas por dos intervalos la G1 que precede a la fase S y el G2 que precede a la mitosis, en estos dos intervalos se lleva a cabo la síntesis de proteína y de ARN (Alberts *et al*, 1998).

Durante estas dos fases la célula tiene que resolver una serie de cambios críticos. Estos incluyen asegurarse que los suficientes desoxirribonucleótidos están disponibles para completar la síntesis de ADN, editar y corregir el ADN recién sintetizado; que el material genético no sea replicado más de una vez; que la organización espacial del huso mitótico sea operacional; que el empacamiento y la condensación de los cromosomas se optimiza; y que exista una distribución equitativa del material celular entre las células hijas. Además, inmediatamente antes y después del ciclo celular, varios factores interactúan para determinar si la célula se divide otra vez o si entra al programa de diferenciación o de muerte celular (Stark *et al*, 2006).

Las cinasas dependientes de ciclinas (Cdk por sus siglas en inglés) son un grupo de enzimas que en su forma activa forman heterodímeros con un grupo de proteínas llamadas ciclinas. La progresión del ciclo celular depende de la activación e inactivación secuencial de un complejo entre una ciclina específica y una Cdk, el cual debe llevar a cabo modificaciones postraduccionales de la Cdk para convertir a la enzima en su forma activa (Bartek *et al*, 2007). Sin embargo la progresión del ciclo celular no solo depende de la formación de los complejos ciclina/Cdk, también existen proteínas, las cuales son reguladoras o efectoras de estos complejos.

Las proteínas reguladoras son llamadas inhibidoras de cinasas dependientes de ciclinas, su rol principal es inhibir la actividad del complejo ciclina/CDK y regular negativamente la progresión del ciclo celular. Las proteínas efectoras son esencialmente factores de transcripción, los cuales son divididos en tres categorías principales dependiendo de su función: (1) aquellos involucrados en el control de las enzimas responsables de la replicación del ADN, (2) aquellos involucrados en la remodelación de los cromosomas y la cromatina y en el control de la integridad genómica, y (3) aquellos involucrados en los mecanismos de la división celular. Estos procesos requieren la síntesis coordinada de cientos de proteínas celulares (Boutros *et al*, 2007).

Durante el ciclo celular, una serie de problemas potenciales pueden causar daño en el genoma. Estos problemas pueden surgir en tres distintas etapas: (1) durante la replicación del ADN, especialmente si la célula está bajo condiciones de estrés que favorezca la formación de ADN dañado (irradiación, exposición a carcinógenos, etc.);

(2) después de que termina la replicación del ADN cuando la célula “apaga” eficazmente su maquinaria de síntesis de ADN; y (3) durante la mitosis, cuando la célula debe negociar la delicada tarea de segregar cromátidas equitativamente. Por lo tanto, es crucial permitir que la célula se detenga durante el ciclo celular con el fin de disponer del tiempo necesario para la correcta realización de todas las operaciones del ADN y el mantenimiento de los cromosomas (Stark *et al*, 2006). Es por eso que en ciclo celular existen puntos de control los cuales tienen que ser superados para que el ciclo pueda continuar, si estos puntos no son superados el ciclo celular será bloqueado hasta que el problema sea reparado. Si se falla en el bloqueo de la célula cuando existe un problema y continúa el ciclo celular pueden ocurrir inestabilidades genéticas, las cuales son características del cáncer (Bartek *et al*, 2007).

Los genes involucrados en el control del ciclo celular están muy expuestos a sufrir alteraciones las cuales dan como origen el surgimiento del cáncer. Sin embargo, la proliferación del cáncer requiere una combinación de varias alteraciones en genes que codifican a las proteínas y que las células conserven sus procesos funcionales en el ciclo celular. Las alteraciones del ciclo celular vistas en el cáncer son principalmente confinadas a dos grupos principales de reguladores: aquellos involucrados en el control negativo de la progresión del ciclo celular (su inactivación da como resultado la aceleración y el descontrol de la proliferación celular) y aquellos involucrados en el mantenimiento de la integridad del genoma en el ciclo celular (su inactivación da como resultado células con alteraciones genéticas que se acumularan progresivamente durante la carcinogénesis) (Lobrich *et al*, 2007).

Muchos genes corresponden a estas dos categorías y están dentro del grupo de genes supresores de tumores, muchos de ellos también, participan directamente en los procesos de reparación del ADN. Este es, por ejemplo, el caso del gen más estudiado en el cáncer, el gen p53. El principal proceso antiproliferativo es controlado por p53 y puede ser descrito como un sensor de estrés, en particular estrés dañino para el ADN. Cuando el ADN de la célula es dañado y no reparado, p53 percibe esta anomalía y activa un gran número de mecanismos antiproliferativos. Estos mecanismos antiproliferativos pueden bloquear la progresión del ciclo celular evitando una división

inapropiada dirigiendo a la célula a diferenciación o la induce a un programa de muerte celular llamado apoptosis. (Olivier *et al*, 2008).

Mutaciones en este gene provocaran que sea incapaz de detener la proliferación de la célula cuando es requerido. Mutaciones en p53 son encontradas en casi todos los tipos de cáncer. Los genes que contribuyen al desarrollo del cáncer a través de la pérdida de su función son llamados genes supresores de tumores, porque en condiciones normales sus productos activos trabajan como un freno que suprime el crecimiento del cáncer. Otro ejemplo es RB1 (también llamado retinoblastoma) este gen evita la síntesis de ARN sin embargo cuando es fosforilado pierde su función permitiendo la síntesis de ARN. Cuando estos dos genes se encuentran mutados, las células no paran de dividirse y evitan entrar al programa de muerte celular, lo que permitirá la formación de una masa tumoral (Hainaut P and Hollstein M, 2000)

3.5 Apoptosis

En los organismos, el número de células es mantenido relativamente constante mediante dos procesos la muerte celular y la división celular, estos procesos permiten que el organismo esté en balance (homeostasis). La necrosis y la apoptosis son dos formas de muerte celular con características morfológicas y bioquímicas distintivas. La necrosis es usualmente inducida por accidente. Las células que mueren por necrosis presentan un aumento en el volumen celular, ruptura en la membrana plasmática y liberación del contenido celular al microambiente, lo que desencadena un proceso inflamatorio que daña a las células vecinas. La apoptosis o muerte celular programada, es un proceso altamente regulado bajo condiciones normales que facilita los procesos fundamentales tales como el desarrollo y la respuesta inmune. La apoptosis involucra células individuales en lugar de áreas de tejidos y no provoca inflamación. La apoptosis es un proceso innato y evolutivamente conservado, en el cual las células se inactivan, se desensamblan y degradan su propia estructura y componentes de una manera ordenada (Ameisen J, 1996).

El proceso apoptótico puede ser dividido en tres etapas: (1) fase de iniciación, (2) fase de ejecución y (3) fase de eliminación.

Fase de iniciación

La muerte apoptótica puede ser desencadenada por diferentes señales intra o extracelulares, en esta fase la célula recibe el estímulo que la conduce a la muerte. Las primeras son, en muchos casos, originadas por estrés biológico, el cual provoca la liberación del citocromo C de la mitocondria (vía intrínseca), mientras que algunas de las señales extracelulares desencadenan el proceso apoptótico al unirse a su ligando presente en la membrana plasmática de la célula blanco (vía extrínseca). La naturaleza de los inductores puede ser biológica, química o física (Hengartner, 2000).

Fase de ejecución

Tanto en la vía extrínseca como en la intrínseca la célula que ha recibido una señal que la induce a apoptosis, pierde contacto con las células vecinas y el citoplasma se contrae provocando una disminución en el tamaño celular. Los organelos citoplasmáticos permanecen intactos, sin embargo, en la mitocondria se dan cambios como la reducción del potencial transmembranal, el desacoplamiento de la cadena de transporte de electrones para la síntesis de ATP y el incremento en la generación de especies reactivas del oxígeno. En etapas posteriores, la cromatina se condensa manteniéndose alrededor de la envoltura nuclear y se fragmenta. Finalmente, la célula apoptótica genera un número variable de vesículas de diferentes tamaños rodeados de membrana plasmática íntegra que contiene parte de la cromatina y de los organelos celulares. Estas vesículas se conocen como cuerpos apoptóticos (Kroemer *et al*, 1997).

La vía extrínseca puede ejemplificarse con la señal proapoptótica que se desencadena por la unión de Fas con su ligando. FasL es un trímero que al unirse con Fas induce la trimerización de éste. Esta unión provoca el reclutamiento del complejo DISC al dominio citoplasmático de Fas. DISC contiene proteínas adaptadoras que permiten la unión de la procaspasa 8 favoreciendo su autoactivación; la caspasa 8 puede entonces activar a las caspasas efectoras 3, 6 y 7. Además, la caspasa 8 puede activar a Bid (miembro proapoptótico de la familia Bcl-2) y ésta inducir a la liberación del citocromo

c y Apaf-1 de la mitocondria para formar el apoptosoma y activar también la vía intrínseca (Nagata S, 1999).

La vía intrínseca o mitocondrial se activa por estrés, y otras señales que provocan la translocación a la mitocondria de miembros proapoptóticos de la familia Bcl-2, como Bax. Lo anterior provoca la liberación del citocromo C al citosol, lo cual se acompaña de la pérdida de potencial de membrana mitocondrial y desestabilización de la membrana externa de la mitocondria. En el citosol, el citocromo C se une a Apaf-1 y una vez unido y en presencia de dATP o ATP se forma el complejo como apoptosoma el cual recluta y activa a la procaspasa 9, la cual se activa y a su vez activar a las caspasa 3, 6 y 7 (Matsuyama *et al*, 2000)

Las caspasas 3, 6 y 7 son las principales responsables de los cambios morfológicos y bioquímicos que ocurren en las células apoptóticas. Dentro de sus funciones destacan la inactivación de proteínas que normalmente protegen a la célula de la muerte apoptótica, de aquellas involucradas en la reparación del ADN y de las encargadas de la organización del citoesqueleto; participan en la destrucción de la lamina nuclear en la activación de CAD e inducen a la célula a expresar señales que las marcan para ser fagocitadas. Uno de los eventos moleculares que ha sido descrito como sello característico del fenómeno apoptótico es la fragmentación del ADN. El material genético es roto inicialmente en pedazos de 50 a 300 kilobases (Kb) y posteriormente en pequeños fragmentos de 180 a 200 pares de bases (pb) y múltiplos de ellos, que son los que por electroforesis generan lo que se conoce como “Patrón escalera” (Logue *et al*, 2008).

Fase de eliminación

Una vez formados los cuerpos apoptóticos, los fagocitos se encargan de retirarlos. Son varios los mecanismos de reconocimiento de las células apoptóticas, lo que asegura la remoción eficiente de células apoptóticas, disminuyendo la posibilidad de que estas células liberen su contenido citoplasmático y causen daño. Un requerimiento esencial para que las células sean reconocidas y fagocitadas es la expresión de un ligando adecuado en su superficie celular y de su contraparte en el fagocito. Uno de los

mecanismos de reconocimiento, es una señal que siempre está presente en los linfocitos apoptóticos, es la pérdida de la asimetría de la membrana celular, la cual tiene como consecuencia la exposición en la membrana externa moléculas de fosfatidilserina (FS), que de manera normal está restringidas a la parte interna. La exposición de la FS es una señal suficiente para inducir la fagocitosis de las células que la expresan (Fadok *et al*, 1992; Krieser *et al*, 2002).

Como se mencionó, una de las características de la apoptosis es que no presenta inflamación, esto no es solo como consecuencia de que la célula sea removida rápidamente sin liberar su contenido citoplasmático, sino que también es debido a que la misma célula apoptótica induce en el fagocito la síntesis y secreción de moléculas antiinflamatorias (Krieser *et al*, 2002)

3.6 Citocromos

Los citocromos son proteínas de color oscuro que desempeñan una función vital en el transporte de energía química en todas las células vivas. Hay tres grandes tipos de citocromos llamados a, b y c, clasificados en función del espectro de absorción y del tipo de grupo hemo.

Los citocromos están incorporados en la membrana celular de las bacterias y en las membranas internas de las mitocondrias (orgánulos presentes en las células animales y vegetales) y de los cloroplastos (que sólo se encuentran en las células vegetales). Las células animales obtienen la energía de los alimentos mediante un proceso llamado respiración aerobia; las plantas capturan la energía de la luz solar por medio de la fotosíntesis.

Los citocromos intervienen en los dos procesos. Durante la respiración y la fotosíntesis, las moléculas de citocromo aceptan y liberan alternativamente electrones, que pasan a otro citocromo en una cadena de reacciones químicas llamada transferencia de electrones, que funciona con liberación de energía. Esta energía se almacena en forma de adenosín trifosfato (ATP). Cuando la célula necesita energía, la toma de sus reservas de ATP.

El citocromo c, es un componente de la cadena respiratoria, funciona como transportador electrónico mitocondrial entre los complejos respiratorios III y IV y actúa como factor proapoptótico cuando es liberado al citoplasma (Youfen, 2006).

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El Cáncer Cérvico-Uterino (CaCU) es una de las principales causa de muerte por neoplasias malignas entre las mujeres mexicanas. Al respecto nuestro grupo de trabajo desarrolla diferentes líneas de investigación con el propósito de contribuir en el conocimiento de los mecanismos de regulación de la proliferación de las células de este tipo de cáncer. Hasta el momento se ha demostrado la presencia del receptor para IL2 (RIL-2) en células de las líneas de carcinoma de cérvix: CALO e INBL positivas al Virus del Papiloma Humano 18 (VPH-18) tanto en cortes histológicos como en cultivos *in vitro* observándose que existe una expresión diferencial de las tres subunidades del receptor lo cual está correlacionado con el estadio del tumor (Alvarado, 1997; Rangel *et al*, 1998) asimismo, se ha demostrado que 100 UI/mL de IL-2 tienen un efecto inhibitor sobre la proliferación *in vitro*, de las líneas celulares de CaCU, fenómeno que se repite en el modelo *in vivo* (Rangel *et al*, 1998; Del Rio 2007). Sin embargo, no se sabe si la expresión del RIL-2 está directamente relacionada con la inserción del Virus del Papiloma Humano 18.

5. JUSTIFICACIÓN

Se sabe que la línea C-33A proveniente de un CaCU negativo a VPH, es usada como control para evaluar si el VPH determina distintas respuestas celulares en diferentes tipos de cáncer. Se sabe que esta línea celular se origina por mutaciones de p53, no asociadas con proteínas virales por lo que pensamos que puede responder de manera diferente a IL-2, por esta razón, el presente trabajo tuvo como objetivo detectar la presencia del receptor de IL-2 en la línea celular C-33A y determinar si existe un efecto antiproliferativo en presencia de esta citocina y si IL-2 regula genes relacionados con la apoptosis como citocromo c.

6. HIPÓTESIS

Se sabe que las líneas de CaCU CALO e INBL (VPH-18) expresan el receptor para IL-2, que ambas líneas responden de forma diferencial a IL-2 y que en altas concentraciones esta citocina regula la expresión del mensajero para citocromo c. Entonces si utilizamos la línea celular de CaCU C-33A negativa a VPH no habrá expresión del RIL-2 en estas células e IL-2 no tendrá ningún efecto sobre la regulación de la expresión de genes mitocondriales como el citocromo c.

7. OBJETIVOS

7.1 Objetivo general

Determinar el receptor para IL-2 en la línea celular de Cáncer Cérvico Uterino C-33A y el efecto antiproliferativo de IL-2 induciendo a apoptosis las células de Cáncer Cérvico-Uterino C-33A mediante la regulación de genes mitocondriales como el citocromo c.

7.2 Objetivos particulares

- Cultivar un millón de células de la línea C-33A de Cáncer Cérvico-Uterino en presencia de 100 UI/ml de IL-2.
- Evaluar el efecto de 100 UI/ml de IL-2 sobre la proliferación de la línea celular C-33A.
- Determinar la presencia de las cadenas α , β y γ de los receptores para IL-2 en la línea celular C-33A por medio de la técnica de ELISA.
- Determinar la presencia de las cadenas α , β y γ de los receptores para IL-2 en la línea celular C-33A por medio de la técnica de RT-PCR.
- Evaluar la presencia de ARNm para citocromo c en la línea celular C-33A tratadas con IL-2 por medio de la técnica RT-PCR.

8. MÉTODO

8.1 Material Biológico

El material biológico consistió en la línea celular de Cáncer Cérvico-Uterino C-33A la cual fue obtenida del material criopreservado de la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer, Laboratorio de Oncología Celular de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.

8.2 Condiciones de cultivo

La línea celular C-33A se cultivo en medio de cultivo RPMI-1640^(MICROLAB), suplementado con 10 % de Suero Fetal Bovino (SFB)^(GIBCO), en botellas de cultivo de 75 cm³. Los cultivos fueron mantenidos en incubadora ^(FORM SCIENTIFIC, USA) con una atmósfera húmeda saturante al 5 % de CO₂, con un pH de 7.0-7.2 y a una temperatura de 37 °C, hasta que alcanzaron una proliferación no menos del 80 % de saturación de las botellas de cultivo.

Las células tumorales C-33A en fase de confluencia fueron separadas del sustrato con verseno. Posteriormente la densidad y viabilidad de las células tumorales en cultivo fue evaluada en cámara de Neubauer ^(AMERICAN OPTICAL, USA) la viabilidad se determinó por exclusión con azul tripano ^(SIGMA). Teniendo un mínimo de viabilidad de un 98% por cada cultivo.

8.3 Evaluación de la proliferación de las células tumoral en presencia de IL-2

En los ensayos se utilizaron placas de 96 pozos, en donde se sembraran 5 X 10³ células por pozo en 200 µl en presencia de IL-2 en diferentes concentraciones (10 y 100 UI). Se empleo un grupo control el cual solo será cultivado con medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con SFB al 10 %. Los cultivos fueron evaluados a diferentes tiempos (a 72, 120, 168 h. Para medir proliferación celular se utilizó la técnica de cristal violeta para lo cual a cada tiempo se fijaran las células con 100 µl de glutaraldehído al 1.1 % y se incubaran por 20 min y transcurrido este tiempo se lavaron 4 veces con 200 µl de

agua desionizada, se dejó secar la placa a temperatura ambiente y se le adicionaron 100 µl de cristal violeta al 1 % disuelto en ácido fórmico a un pH de 6.8 y se mantuvo la placa en agitación por un lapso de 10 min., posteriormente se retiró el cristal violeta por absorción con micropipeta y se lavó la placa a chorro de agua, se dejó secar a temperatura ambiente y se adicionaron 100 µl de ácido acético al 10 % y se dejó en agitación por 20 min y se procedió a la lectura de la absorbancia a 570 nm (DO_{570}) directamente sobre los pozos colocando la placa sobre un lector de ELISA. Los ensayos se realizaron por triplicado.

8.4 Ensayo de ELISA para determinar el RIL-2

Se sembraron 3×10^4 células sincronizadas por pozo en la inmunoplaaca de 96 pozos con 200 µl de medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con 10 % de SFB y fueron incubadas por 24 horas posteriormente se realizaron 4 lavados con 150 µl de solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS) y fijaron con 100 µl de glutaraldehído al 1.1% y se incubaron por 20 min, el glutaraldehído fue retirado por absorción y se realizaron 4 lavados con PBS. Se bloqueó la placa con PBS/BSA (albúmina de suero bovino) al 1 % por 1 h. Se adicionaron 50 µl de anticuerpo antiRIL-2 a 500 µg/ml de PBS/BSA al 3 % y se incubaron por 2 h a 37 °C. Transcurrido este tiempo se lavaron 4 veces con PBS-Tween al 0.1 %. Se adicionó el segundo anticuerpo conjugado con peroxidasa diluido 1:200 en PBS/BSA al 3 % y se incubó por 2 h, se lavó 4 veces con PBS-Tween al 0.1 %. Se le adicionó 100 µL de solución OPD y se guardó por 10 min en ausencia de luz, la reacción se detuvo por adición de 25 µl de H_2SO_4 2.5N. Finalmente se evaluó en el lector de ELISA a una absorción de 490 nm.

8.5 Extracción de ARNm

La línea celular C-33A se cultivó en medio de cultivo RPMI-1640, cuando alcanzaron una proliferación no menos del 80 % de saturación de las botellas de cultivo. Se procedió a contabilizar las células en la cámara de Neubauer. De acuerdo a la cantidad de células se realizó el cálculo correspondiente para obtener un millón de células por ensayo. Posteriormente transcurridos los tiempos de ensayo (a 30 min, 2, 48, 96 y 144

h) se le agregó al botón celular 1ml de Trizol® dejándolo actuar por 10 minutos para que se llevara a cabo la reacción (lisado), transcurrido el tiempo se agregaron 200 µl de la mezcla alcohol isoamílico-cloroformo [1:24] y se mezcló vigorosamente. Se centrifugó a 3000 g, durante 15 minutos a una temperatura de 4-8 °C. Se obtuvo la fase acuosa y se adicionó 500 µl de Isopropanol frío centrifugando nuevamente para que se llevara a cabo la precipitación del ARN, para finalmente decantarlo y agregar 1 ml etanol al 70 % y se dejó actuar por un lapso de 15 minutos para posteriormente desechar cuidadosamente el etanol con ayuda de una micropipeta para evitar pérdida del ARN. El último paso fue el secado de la muestra de RNA a temperatura ambiente durante dos horas aproximadamente. Ya libre de alcohol se resuspendió en 20µL de agua libre de ARNasas para hidratarlo y así obtener nuestro primer stock. Se determinaron las concentraciones de cada una de las muestras realizando una segunda dilución [4:200] con agua DEPC (segundo stock), procediendo a su cuantificación en el espectrofotómetro ^(EPPENDORF, USA) a una absorbancia de 260 nm, 280 nm.

8.5.1 Retrotranscripción del ARNm

De acuerdo a la concentración de ARNm obtenido se determinó el volumen de la solución necesaria para tomar 2 µg/µl de ARNm requerido en la técnica. Se procedió a la retrotranscripción de cada una de las muestras se incubaron en el termociclador durante 1 h a 42 °C. Obteniendo así el ADN complementario.

8.6 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Los productos del RT, fueron utilizados para la amplificación del ADNc del citocromo c y para determinar la presencia de las tres cadenas del receptor par IL-2, en presencia de los oligonucleótidos correspondientes. La amplificación se llevó a cabo bajo condiciones determinadas (apéndice 1). Posteriormente se guardaron los productos del PCR en congelación (-20 °C) hasta su uso.

8.6.1 Electroforesis de los productos de PCR

Se prepararon los geles de agarosa al 1.5 % en TBE 1X añadiendo 30 μ l de bromuro de etidio. Ya polimerizado se colocó en el primer pozo del gel el control de pesos moleculares (escalera PB) para ubicar por su tamaño el citocromo c y las tres cadenas de IL-2, posteriormente se colocaron 4 μ l de cada una de las diferentes muestras (productos PCR) en los pozos del gel. Se corrió el gel en una cámara de electroforesis (OWL, USA), cubierto de TBE 0.5 % a 80-90 volts durante 60 min. Finalmente se colocó el gel en un transiluminador (UVP, USA) que con ayuda de la luz ultra violeta se observaron los productos.

9. RESULTADOS

Se sabe que el principal agente etiológico del carcinoma del Cáncer Cérvico-Uterino es la infección por VPH, que a través de la inserción de su genoma en la célula huésped produce un gran número de cambios moleculares en la célula e incluso puede apagar genes o bien encender aquellos que se encontraban apagados. Datos recientes indican que entre los cambios que se suelen presentar las células de CaCU es responder a factores de proliferación hematopoyéticos, como IL-2 (Bermúdez *et al*, 2005). Sin embargo, no se tiene información que aclare si células de líneas de CaCU negativas a VPH también responden a esta citocina.

Con el propósito de determinar el efecto de IL-2 sobre células de líneas de CaCU negativas a VPH. En el presente trabajo se evaluó por el método de cristal violeta la proliferación de la línea celular C-33A negativa a VPH cultivada en presencia de IL-2. Las interleucinas en un principio fueron caracterizadas como glicoproteínas bioactivas secretadas por células linforreticulares involucradas en la modulación y coordinación de diversas funciones de células inmunes (Mizel 1989). Sin embargo, en la actualidad se sabe que las células de las líneas de CaCU CALO e INBL responden a la acción mitogénica de IL-2, además se ha reportado que el RIL-2 es activado por la IL-2 exógena, y que 10 UI/mL induce la proliferación, mientras que, 100 UI/mL la inhibe. Se sabe que estas líneas celulares expresan proteínas virales de VPH 18 y que por esta razón pueden expresar RIL-2 (Alvarado, 1997; Rangel *et al*, 1998).

9.1 Evaluación de la proliferación de la línea celular de CaCU C-33A estimuladas con IL-2.

Con el propósito de evaluar el efecto de IL-2 sobre la proliferación de la línea de CaCU C-33A se realizó una cinética de proliferación con células de esta línea celular a (1, 2, 4 y 6 días) en ausencia y en presencia de IL-2 (10 y 100 UI/ml). Los resultados indican, a diferencia de lo que se esperaba, las células cultivadas en presencia de 10 UI/mL muestran los mismos niveles de proliferación en comparación con las células que fueron cultivadas en ausencia de IL-2 (Figura 6a y 6b). Por otro lado, la evaluación de la cinética de proliferación de las células cultivadas en presencia de 100 UI/mL de

IL-2 también, muestran los mismos niveles de proliferación en comparación de con las células cultivadas en presencia de 10 UI/mL de IL-2 (Figura 6a y 6c).

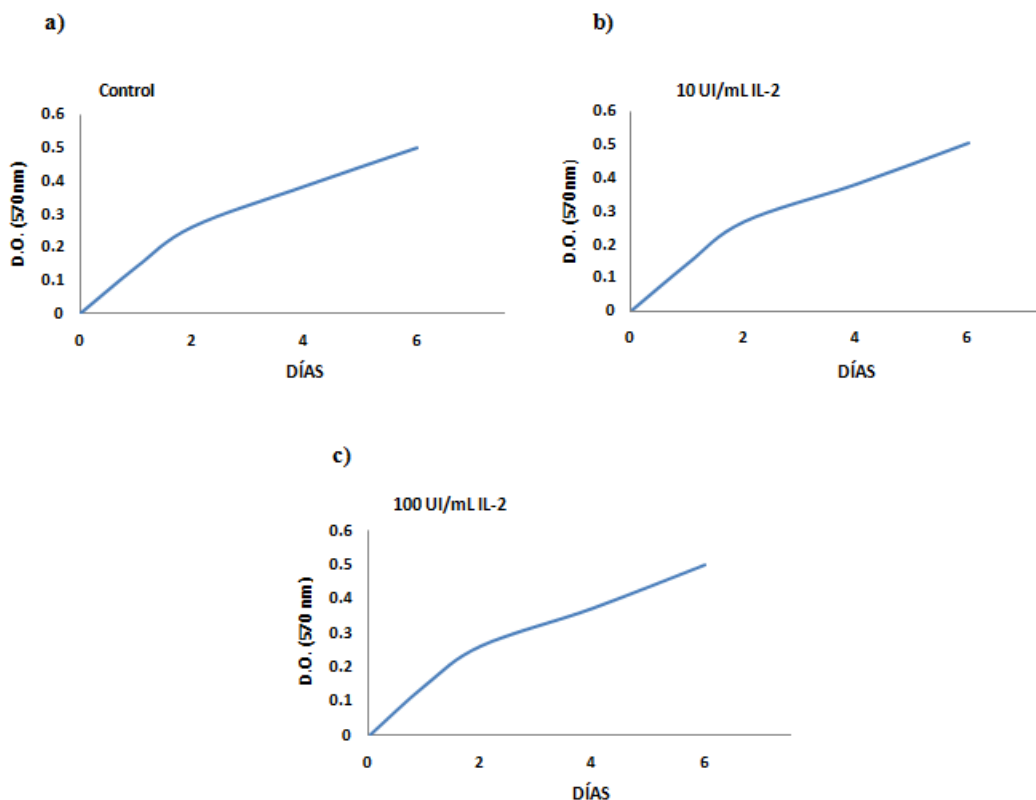


Figura 6.- Cinética de proliferación de células C-33A. Se sembraron 5×10^3 células de la línea C33-A a 1, 2, 4, y 6 días en ausencia y presencia de 10 y 100 UI/mL de IL-2. Los resultados muestran cinéticas de proliferación similares entre las células cultivadas en ausencia de IL-2 (a) con las células cultivadas en presencia de IL-2 (b) (c). Sin diferencia entre las cinéticas de proliferación con las dos concentraciones de IL-2.

9.2 Determinación de la presencia de las cadenas α , β y γ del receptor para IL-2 en la línea celular C33 por medio de la técnica de ELISA.

Al observar que las células C-33A no presentaron una respuesta ante IL-2 y con la finalidad de confirmar que la falta de respuesta de las células a IL-2 se debe a la no expresión del RIL-2 en la línea celular, se evaluó la presencia de las subunidades de RIL-2 por medio de la técnica de ELISA utilizando anticuerpos específicos contra las cadenas α , β y γ de RIL-2. Se cultivaron por 24 h células sincronizadas en presencia y

ausencia de 100 UI/mL de IL-2, utilizando como control positivo para la expresión del RIL-2 Linfocitos de Sangre Periférica de donadores sanos.

Los resultados muestran que tanto en las células cultivadas en ausencia de IL-2 (-) como en presencia de IL-2 (+), no se detectó la presencia de ninguna de las 3 cadenas del RIL-2, mientras que, en LSP se observa la presencia de las tres cadenas (Figura 7).

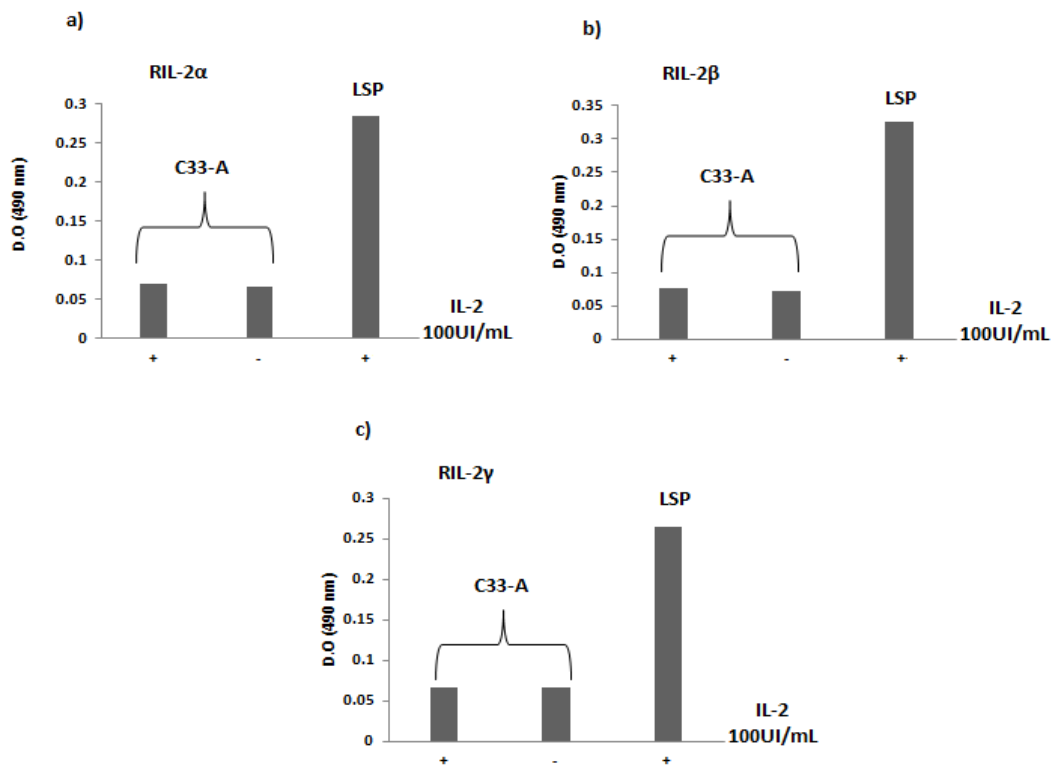


Figura 7.- Presencia de las cadenas α , β y γ del receptor para IL-2 (RIL-2) en células C-33A por la técnica de ELISA. Se cultivaron por 24 horas células sincronizadas en ausencia (-) y presencia (+) de 100 UI/mL de IL-2, así como Linfocitos de Sangre Periférica (LSP) como control positivo. Los resultados indican una ausencia de las cadenas α (a), β (b) y γ (c) en células cultivadas en presencia o ausencia de IL-2, en comparación de los resultados obtenidos con los LSP que son positivos para las tres cadenas. Se realizó una prueba estadística de T de student obteniendo un valor de alfa 0.01.

Con la finalidad de confirmar los resultados obtenidos en el ensayo de ELISA, de la no presencia del RIL-2, en la línea celular C33-A. Se procedió a determinar la presencia del mensajero para las cadenas de RIL-2 por la técnica de RT-PCR. En esta técnica se utilizó como control interno la amplificación de β -actina.

9.3 Expresión de β -actina en la línea celular de CaCU

Después de obtener el ARNm de 1×10^6 células de la línea C-33A, se llevó a cabo la retrotranscripción para obtener el ADNc de cada una de las muestras cultivadas a 0.5 h, 2 h, 48 h, 96 h, y 144 h en presencia ó ausencia de de 100 UI/ml de IL-2. El ADNc fue utilizado para confirmar que las condiciones de las PCR son las adecuadas y que es confiable para amplificar cualquier primer. Para ello, se realizó la amplificación de β -actina, cuyo producto fue utilizado en el presente trabajo, como control interno de la técnica de RT-PCR. β -actina es una proteína constitutiva de las células, ya que se encuentra en síntesis continua en células metabólicamente activas, por lo cual su mensajero se encuentra siempre presente.

Los resultados obtenidos muestran, para la línea celular C-33A, una banda de amplificación de 232 pb, que corresponden al producto esperado para β -actina (Figura 8). Tanto las células cultivadas en presencia de IL-2 (+), como las células cultivadas en ausencia de IL-2 (-), se observa un productos de amplificación homogéneos con respecto al tiempo de cultivo (Figura 8).

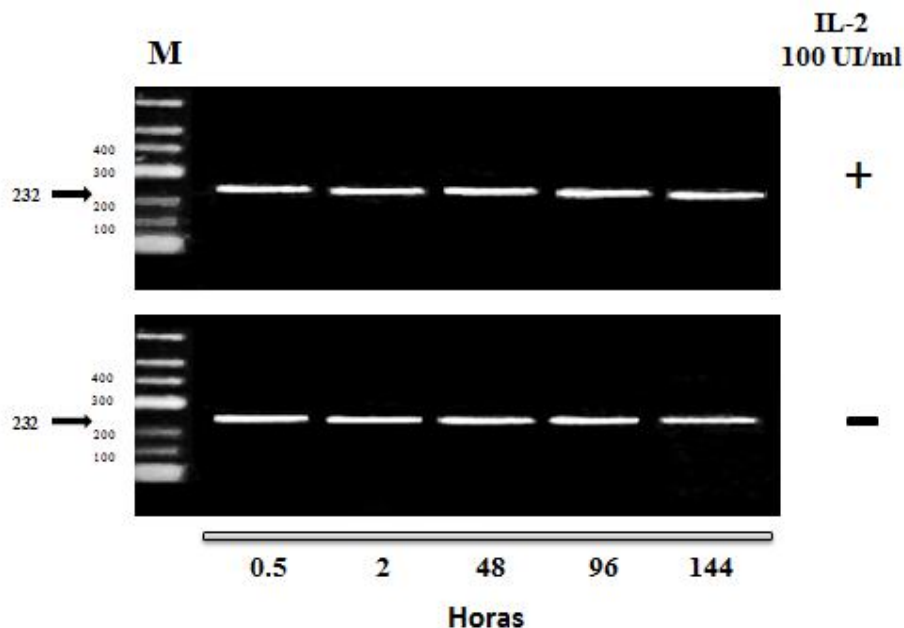


Figura 8.- Expresión de β -actina en la línea celular C-33A. Células cultivadas en presencia de IL-2 100UI/mL (+). Células cultivadas en ausencia de IL-2 (-). Tiempo de cultivo 0.5 h, 2 h, 48 h, 96 h, y 144 h. La determinación del producto de amplificación de 232 pb para β -actina se realizo por RT-PCR. Las células cultivadas en presencia de IL-2, así como, en ausencias de esta citocina muestran una igualdad en la expresión del producto de amplificación. M: marcador molecular en pb.

Después de confirmar que las condiciones de la RT-PCR son las adecuadas para la amplificación de los primers, se procedió a amplificar los productos para las cadenas α , β y γ de RIL-2 con ayuda de primers específicos.

9.4 Expresión de la cadena α del RIL-2 en la línea celular C33-A

Los resultados obtenidos en los productos de amplificación de la cadena α de RIL-2, en células de la línea C-33A cultivadas en presencia ó ausencia de IL-2, no muestran la expresión del mensajero para esta cadena en ninguno de los tiempos de cultivo. A diferencia del control positivo, que consistió de una muestra de LSP cultivados en presencia de IL-2 por 24h. Los resultados para los LSP muestran un producto de 197 pb esperado para la cadena α (Figura 9).

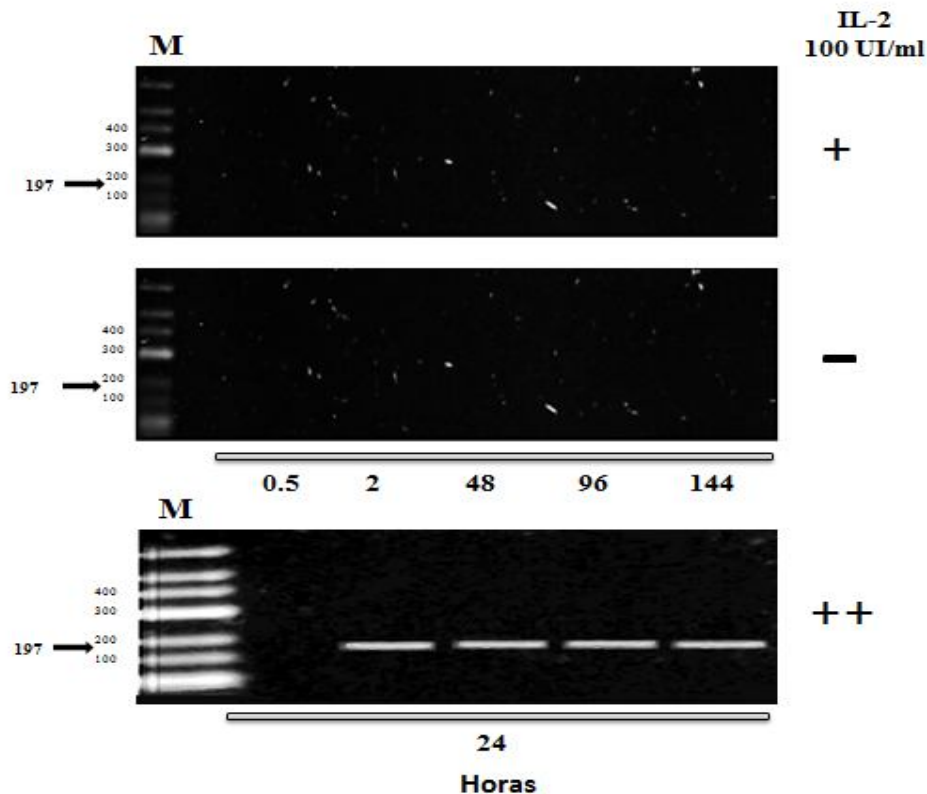


Fig. 9.- Expresión de la cadena α del RIL-2 en la línea celular C33-A. Células cultivadas en presencia de IL-2 100 UI/m (+). Células cultivadas en ausencia de IL-2 (-). Tiempo de cultivo 0.5 h, 2 h, 48 h, 96 h, y 144 h. Los resultados no muestran producto de amplificación para la cadena α de RIL-2 en las muestras de la línea C33-A cultivadas en presencia o ausencia de IL-2 sin importar el tiempo de cultivo. Sin embargo, los LSP control positivo (++) cultivados por 24 h muestran un producto de amplificación de 197 pb para la cadena α . M: marcador molecular en pb.

9.5 Expresión de la cadena β del RIL-2 en la línea celular C33-A

Cuando se realizó la amplificación para la cadena β de RIL-2, en células de la línea C33-A cultivadas en presencia ó ausencia de IL-2 no se obtuvieron productos de amplificación con los primers utilizados en ninguno de los tiempos de cultivo, incluso en el control positivo en el cual se cultivaron LSP en presencia de IL-2 por 24 h, tampoco se observa el producto de 206 pb esperado para la cadena β (Figura 10).

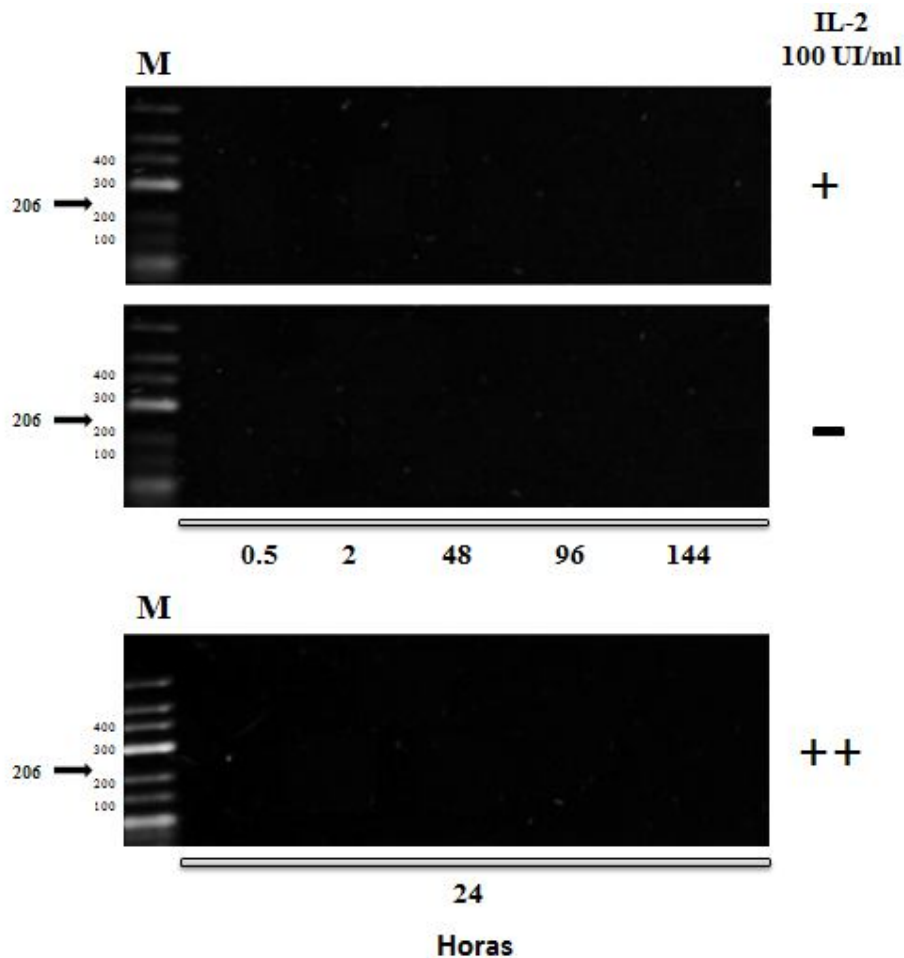


Figura 10.- Expresión de la cadena β del RIL-2 en la línea celular C33-A. Células cultivadas en presencia de IL-2 100UI/mL (+). Células cultivadas en ausencia de IL-2 (-).Tiempo de cultivo 0.5h, 2h, 48h, 96h, y 144h. Los resultados no muestran producto de amplificación de 206 pb esperado para la cadena β de RIL-2 tanto en las muestras cultivadas en presencia o ausencia de IL-2, como en LSP control positivo (++) cultivados por 24h. **M:** marcador molecular en pb.

9.6 Expresión de la cadena γ del RIL-2 en la línea celular C33-A

En el caso de la cadena γ de IL-2, en células de la línea C-33A cultivadas en presencia ó ausencia de IL-2 se obtuvieron resultados semejantes a los obtenidos en la cadena α , ya que no se observa expresión del mensajero en ninguno de los tiempos de cultivo: 0.5 h, 2 h, 48 h, 96 h, y 144 h. A diferencia de los resultados para el control positivo con LSP en donde se observa el producto de 206 pb esperado para la cadena γ (Figura 11).

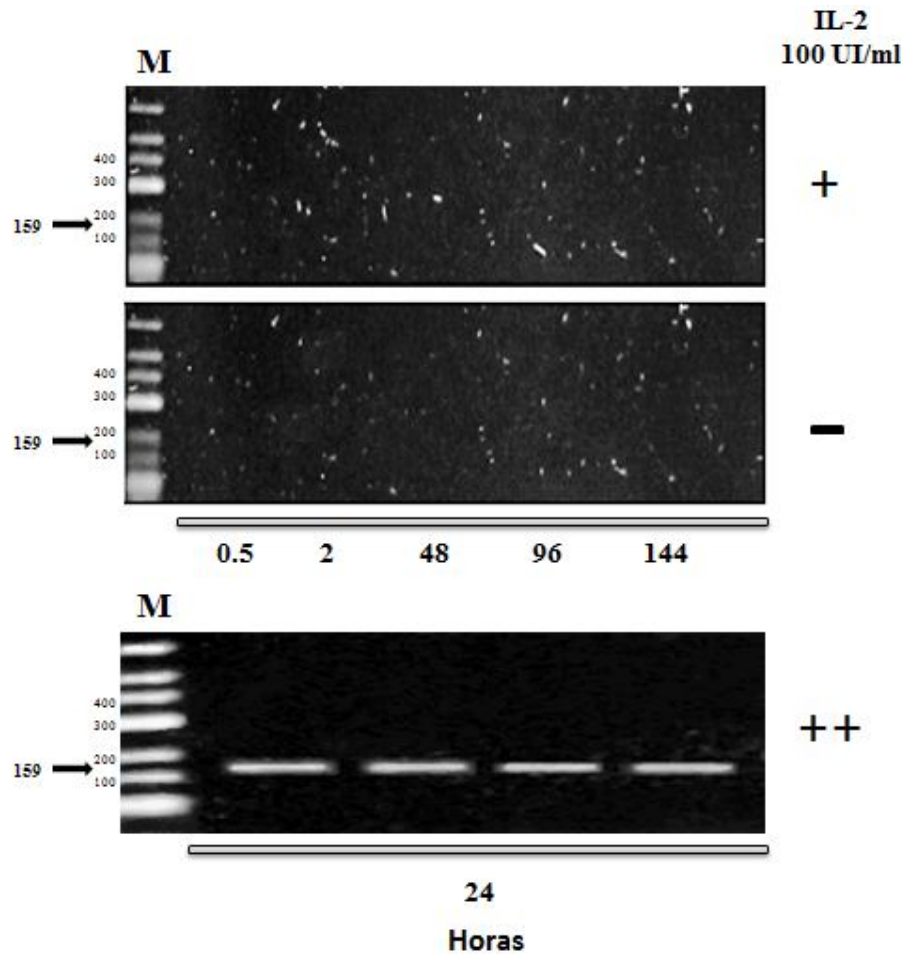


Figura 11.- Expresión de la cadena γ del RIL-2 en la línea celular C33-A. Células cultivadas en presencia de IL-2 100 UI/ml (+). Células cultivadas en ausencia de IL-2 (-).Tiempo de cultivo 0.5 h, 2 h, 48 h, 96 h, y 144 h. Los resultados no muestran producto de amplificación para la cadena γ de IL-2 en las muestras cultivadas en presencia o ausencia de IL-2 sin importar el tiempo de cultivo. Sin embargo, en LSP control positivo (++) cultivados por 24h se obtuvo un producto de amplificación de 159 pb esperado para la cadena γ . **M:** marcador molecular en pb.

9.7 Expresión de Citocromo c en la línea celular C33-A

Se sabe que IL-2 puede inducir la apoptosis de células de CaCU positivas a VPH, sin embargo, aun no está muy claro porque vía IL-2 induce la muerte por apoptosis de estas células., Se ha reportado que IL-2 induce el ARNm para proteínas mitocondriales, claves en la activación de la vía intrínseca. La secuenciación de los transcritos de estos ARN guardan un 95% de homología con citocromo c que, se sabe, es liberado al citosol durante el proceso de apoptosis por lo que pensamos que IL-2 podría estar regulando esta vía.

Por lo que con los resultados obtenidos en este trabajo en las células de CaCU C33-A que indican que no hay expresión del receptor para IL-2, indican que en estas células IL-2 no induciría la muerte por apoptosis. Por esta razón se procedió a evaluar la presencia de productos de amplificación para citocromo c en células C-33A cultivadas en presencia de IL-2.

Los resultados obtenidos muestran un producto de amplificación de 183 pb que corresponden al esperado para citocromo c. Se observa la expresión del mensajero en los distintos tiempos de cultivo 0.5 h, 2 h, 48 h, 96 h, y 144 h, el cual aumenta conforme transcurre el tiempo, obteniendo la mayor expresión del mensajero a 96h y una disminución a 144h tanto en células cultivadas en presencia de IL-2 100 UI/ml como en ausencia de IL-2 (Figura 12).

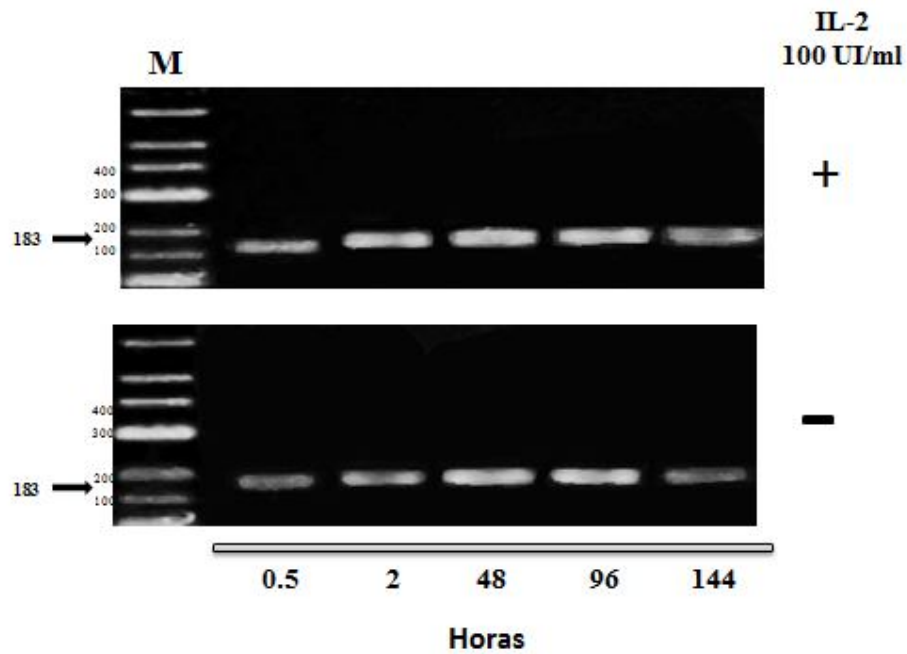


Figura 12.- Expresión de citocromo c en la línea celular C33-A. Células cultivadas en presencia de IL-2 100 UI/ml (+). Células cultivadas en ausencia de IL-2 (-). Tiempo de cultivo 0.5 h, 2 h, 48 h, 96 h, y 144 h. Las células cultivadas en presencia de IL-2, así como, en ausencia de IL-2 muestran una igualdad en la expresión del producto de amplificación de 183 pb esperado para citocromo c, observándose un aumento de la expresión conforme transcurre el tiempo siendo mayor a 96 h y disminuye a 144 h. **M:** marcador molecular en pb.

10. DISCUSIÓN

En la última década ha crecido el interés por estudiar el problema del cáncer desde un punto de vista inmunológico con el propósito de conocer detalles de los mecanismos de escape que presentan dichas células. La investigación sobre los mecanismos de evasión inmunológica de las células tumorales y la capacidad de muchos tumores para persistir, constituye actualmente un campo de estudio sobre el efecto de algunas citocinas, como las interleucinas, sobre la proliferación de células tumorales, en particular el efecto de interleucina-2 (IL-2). Que es una citocina que estimula la proliferación de linfocitos T, células B, NK y monocitos a través de sus receptores (RIL-2) a nivel de membrana (Minami *et al*, 1993). Para la activación de linfocitos es necesaria la unión de la citocina a su receptor. El receptor para IL-2 (RIL-2) está compuesto de tres cadenas o subunidades: α , β y γ , que al expresarse de manera diferencial permiten que se realicen combinaciones entre ellos que dan como resultado un grado de afinidad diferente a su ligando para cada tipo de receptor, así tenemos receptores de baja, intermedia y alta afinidad (Nelson *et al*, 1994). El RIL-2 no sólo se expresa en células linfoides también, se ha demostrado su expresión en células de origen no hematopoyético, como fibroblastos humanos, células endoteliales y células epiteliales intestinales. De igual manera se ha encontrado ampliamente distribuido en distintos tumores sólidos (Romo *et al*, 2009)

Por su parte IL-2 recombinante es una de las citocinas empleadas en la inmunoterapia contra tumores sólidos, dada su capacidad de activar sistemas citotóxicos antitumorales del huésped. El uso de IL-2 como terapia contra el cáncer se ha empleado en diversos modelos tumorales, como el Cáncer Cérvico-Uterino (CaCU) para el cual, el grupo de trabajo del Laboratorio de Oncología Celular, la propone como una alternativa terapéutica para este tipo de tumor, que en México es un grave problema de salud pública, con una tasa de 5000 muertes por año (Ferlay *et al*, 2008).

Ahora bien, respecto a la importancia de la expresión del RIL-2 en células de CaCU y su respuesta a IL-2 para la progresión tumoral, se ha demostrado que la presencia del receptor para IL-2 de alta afinidad en las líneas celulares CALO e INBL tiene una expresión diferencial dependiente del estadio clínico del tumor. Y que este receptor,

también, tiene una respuesta diferencial a IL-2, esto en función de la concentración de IL-2 administrada; 1) Se puede inhibir su proliferación en presencia de 100 UI/ml de IL-2 desencadenando una respuesta apoptótica; 2) O bien se puede inducir su proliferación en presencia de 10 UI/ml (Alvarado, 1997; Rangel *et al*, 1998).

Por otro lado, se ha reportado que estas células de CaCU CALO e INBL, no solo expresan RIL-2 sino que también, producen y secretan IL-2 lo que sugiere que las células de CaCU han adquirido una dependencia por este factor para su proliferación que puede servir como un mecanismo de evasión inmunológico (Rangel *et al*, 2010).

Sin embargo, en los resultados aquí presentados demostramos que la línea celular de CaCU C-33A no responde de manera diferencial a distintas concentraciones de IL-2 exógena, ya que tanto a altas como bajas concentraciones no modifica su proliferación con respecto al control. El que las células C-33A no respondan al efecto de IL-2, a diferencia de las líneas CALO e INBL, lo podemos atribuir al hecho de que la línea C-33A no presenta proteínas del VPH-18, pensamos que la infección por VPH-18 puede ser el responsable de la expresión del RIL-2 en las células de CaCU positivas al VPH a diferencia de C33-A que es negativa a VPH. Sugerimos que durante el proceso de transformación neoplásica, inducida por el VPH-18, en las células del cérvix se activan genes involucrados con la expresión del RIL-2. Esta suposición, también se basa en los resultados de Casana P. 2002 que al transfectar la línea celular de CT3 de fibroblastos de ratón con DNA de VPH-16 y al administrar IL-2 exógena observa una inhibición de la proliferación de las masas tumorales como una respuesta ante la transfección.

En el caso de nuestros resultados al observar que no hay una modificación de la proliferación de las células C-33A en presencia de IL-2 exógena y con la finalidad de evaluar la posible presencia del RIL-2 en estas células, se procedió a utilizar anticuerpos específicos contra las cadenas α , β y γ de RIL-2 mediante la técnica de ELISA, que es una técnica de inmunodetección muy específica. Los resultados indican la no presencia de las cadenas del RIL-2, a diferencia de las líneas de CaCU CALO e INBL en las que se observa la presencia de las 3 cadenas del RIL-2 y muestran una respuesta diferencial a IL-2 (Rangel *et al*, 2010). Estos datos, también, apoyan la teoría de que la expresión del RIL-2 en células de CaCU es regulada por la presencia del VPH.

Por otro lado, se ha reportado que estas células de CaCU CALO e INBL, no solo expresan RIL-2 sino que también, producen y secretan IL-2 lo que sugiere que las células de CaCU han adquirido una dependencia por este factor para su proliferación que puede servir como un mecanismo de evasión inmunológico (Rangel et al, 2010). Estos resultados se ven apoyados con los obtenidos por Mindiola R. 2008 que reporta un incremento de IL-2, en Neoplasias Cervicales Intraepiteliales (NICs), positivas a VPH y que además expresan el RIL-2. Estos resultados apoyan nuestra teoría la cual sugiere que el VPH confiere a las células de CaCU la capacidad de utilizar distintas citosinas en particular IL-2 no solo como un mecanismo de evasión inmunológico, sino que también la usan como factor de proliferación para sustentar su progresión en el desarrollo del cáncer. Estos resultados son de gran relevancia ya que demostramos que en células no infectadas con VPH no existe la síntesis de las cadenas β y γ , del RIL-2 a través de las cuales IL-2 lleva a cabo la transducción de señales, por lo cual IL-2 no muestra ningún efecto sobre la proliferación de la línea C-33A.

Para confirmar que las células C-33A, no expresan las cadenas del RIL-2 se utilizó la técnica RT-PCR para determinar la presencia del ARNm para las cadenas α , β y γ de IL-2. Se utilizó esta técnica por su alta especificidad en la amplificación de productos de interés.

Antes de realizar la RT-PCR para las cadenas del RIL-2, se obtuvieron los productos para β -actina, que se usó como control interno de la técnica, dada su característica de ser una proteína constitutiva de la célula, ya que desempeña una variedad de funciones biológicas en los componentes que la integran, como el citoesqueleto, dentro de sus principales funciones biológicas están relacionadas con la movilidad celular y los cambios en la forma de la célula durante el ciclo celular, también, participa en la organización del citoplasma para generar fuerzas mecánicas dentro de la célula en respuesta a diversas señales extracelulares. Es esencial para algunas actividades contráctiles, controla las interacciones celulares, la adhesión molecular y transporte intracelular. Por lo cual β -actina es utilizado como un indicador de síntesis proteica continua por lo cual en este estudio el mensajero para esta proteína es utilizado como control positivo de la amplificación (Bas *et al*, 2004; Mori *et al*, 2008).

Por lo que al haber obtenido productos de amplificación de 232 pb homogéneos para β -actina, en los ensayos corroboramos que las condiciones de amplificación empleadas en la PCR fueron correctas, con lo cual podemos obtener resultados confiables durante la determinación de los productos de amplificación para la cadena α (197 pb), β (206 pb), γ (159 pb) y citocromo c (183 pb).

Una vez confirmado que las condiciones de la PCR son adecuadas para la amplificación del primer de nuestro interés y después de realizar la amplificación para las tres cadenas del RIL-2. Los resultados muestran la ausencia de las cadenas del RIL-2 en las células de la línea C-33A a diferencia de los datos obtenidos para LSP (control positivo) donde se observa la expresión de las cadenas α y γ pero no de β , por lo que pensamos que el primer utilizado para esta cadena no era el correcto quizá debido a un mal diseño, no obstante, al detectar la presencia de las cadenas α y γ es de esperarse que también este la cadena β ya que estas tres forman el receptor de alta afinidad en LSP para responder a IL-2, tal como lo observamos en nuestro experimento.

Otro dato que apoya la teoría de que la presencia del RIL-2 en células de CaCu, depende de la presencia del VPH es el siguiente. Líneas celulares de CaCu positivas para VPH como CALO e INBL que expresan el RIL-2, cuando son cultivadas en presencia de IL-2 son inducidas a muerte por apoptosis con un incremento en el mensajero para citocromo c. Mientras que en la línea celular C-33A en presencia de IL-2 no observamos regulación de la expresión del mensajero para citocromo c, ya que tanto las células cultivadas en ausencia como en presencia de IL-2 se observa un producto de amplificación para esta proteína semejante. Y la expresión de citocromo c observada en las células C-33A se puede atribuir a una activación de la cadena respiratoria ya que citocromo c participa en el transporte de electrones en este proceso de las células metabólicamente activas. La disminución en la expresión del mensajero para citocromo c a 144 horas en las células C-33A se puede atribuir a un ciclo de acción de la cadena respiratoria en las células. En donde el aumento de la expresión del mensajero para citocromo c en presencia de IL-2 no sería tan solo para inducir apoptosis, tal y como sucede en las líneas de CaCu CALO e INBL positivas a VPH 18, sino para sustentar la supervivencia de las células en una regulación típica de células normales. Estos resultados indican que en células de CaCu positivas a VPH 18, IL-2 las

induce a muerte por apoptosis, mientras que en células de CaCU negativas a HPV (C33-A) no tiene este efecto.

11. CONCLUSIONES

- **IL-2 no induce la proliferación en la línea celular C33-A**
- **IL-2 no inhibe la proliferación en la línea celular C33-A**
- **La línea celular C33-A no expresa la cadena α del RIL-2**
- **La línea celular C33-A no expresa la cadena β del RIL-2**
- **La línea celular C33-A no expresa la cadena γ del RIL-2**
- **IL-2 no regula la expresión del mensajero para citocromo c en la línea celular C-33A**

12. BIBLIOGRAFIA

Aguzzi A y Heikenwalder M (2005). Cytokines and chemokines: a meeting in lymphoid organs. *Immunity*, 22: 145-54.

Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. (1998). *Essential Cell Biology*, Garland Publishing, Inc. New York and London, USA, pp. 547-562 y 582-584.

Alvarado M. J (1997). Presencia de la cadena α y β del receptor para interleucina 2 (RIL-2) en células tumorales de carcinoma cérvico uterino (CaCu) y el efecto proliferador inducido por la interleucina 2 (IL-2) en estas células tumorales: un posible mecanismo de escape inmunológico. Tesis de Licenciatura. FES-Zaragoza UNAM, México.

Ameisen J (1996). The origin of programmed cell death. *Science*, 272:278-1279.

Arima N, Kamio M, hnada K, Hori T, Hattori T, Tsudo M, Okuma M and Uchiyama T (1992). Pseudo-high affinity interleukin 2 (IL-2) receptor lacks the third component that is essential for functional IL-2 binding andintersignaling.1 *Exp Med*, 176, 1265 -1272.

Arkin M, Randal M, DeLano W, Hyde J, Luong TN, Oslob J, Raphael R, Taylor L and Wang J (2003). Binding of small molecules to an adaptive protein-protein interface *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100. 1602-1608

Bañuelos A, Reyes E, Ocadiz R, Alvarez E, Moreno M, Monroy A y Gariglio P Neocarzinostatin (2003). Induces an Effective p53-Dependent Response in Human Papillomavirus. *Pharmacology*, 306(2):671–680.

Bartek J and Lukas J (2007). DNA damage checkpoints: from initiation to recovery or adaptation. *Curr Opin Cell Biol* 19: 238-245.

Bas A, Forsberg G, Hammarström S, Hammarström ML (2004). Utility of the housekeeping genes 18S rRNA, beta-actin and glyceraldehyde-3-phosphate-

dehydrogenase for normalization in real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis of gene expression in human T lymphocytes. *Scand J Immunol.* 59(6):566-73

Bermúdez M, Peralta Z y Madrid M (2005). Terapia génica con citocinas contra cáncer cervicouterino. *Salud pública México*, 47(6):1-18.

Boni L, Batenjany M, Neville E, Guo Y, Xu L, Wu F, Mason J, Robb R y Popescu M (2001). Interleukin-2-induced small unilamellar vesicle coalescence. *Elsevier Science B.V*, 1514:127-138.

Bosch F, Lorincz A, Munoz N,. (2002). The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* 55: 244-265.

Bosco M, Espinoza-Delgado I, Schwabe M, Russell S, Leonard W, Longo D and Varesio L (1994). The γ subunit of the interleukin-2 receptor is expressed in human monocytes and modulated by interleukin-2, interferon γ , and transforming growth factor β 1. *Blood*, 83, 3462-3467.

Boutros R, Lobjois V, Ducommun B (2007). CDC25 phosphatases in cancer cells: key players? Good targets? *Nat Rev Cancer* 7: 495-507.

Boyle P and Levan B (2008) "World cancer report 2008" International Agency for Research on Cancer, Scientific Publications.

Boyle P, Smans M (2008). IARC Scientific Publications, Number 159, Atlas of cancer mortality in the European Union and the European Economic Area 1993-1997. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer.

Casana PH, Hernandez H, Arana MJ (2002). Interleukin-2 inhibits proliferation of HPV-associated tumor cells and halts tumor growth in vivo. *Biochem Biophys Res Commun.* 299(5):818-24.

Casey L, Lichtman, A and Boothby M (1992). IL-4 induces IL-2 receptor p75 β -chain gene expression and IL-2-dependent proliferation in mouse T lymphocytes. *J Immunol*, 148, 3418-3426.

Coventry J, Weeks C, Heckford E, Sykes J, Bradley J. y Skinner M (1996). Of IL-2 Cytokine Expression Despite IL-2 Messenger RNA Transcription in Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Primary Human Breast Carcinoma. *Immunology*, 156:3486-3492.

Del Rio Ortiz Itzel (2007). Determinación de las citocinas il-4, il-10, ifn gamma y TNF alfa en células de bazo de ratón, activadas con IL-2 encapsulada. Tesis de Licenciatura. FES-Zaragoza UNAM, México.

Dzul R, Puerto S y González L (2004). Cáncer cervicouterino: métodos actuales para su detección. *Rev Biomed*,15(4):233-241.

Fadok V, Voelker D, Campbell P, Cohen J, Bratton D, Henson P (1992). Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol*,148:2207-2216.

Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C and Parkin DM. GLOBOCAN 2008 v1.2, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2010.

Friedmann M, Migone T, Russell S and Leonard W (1996). Different interleukin 2 receptor β -chain tyrosines couple to at least two signaling pathways and synergistically mediate interleukin 2-induced proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93, 2077-2082.

Gnarra J, Otani H, Wang M, McBride O, Sharon M and Leonard W (1990). Human interleukin 2 receptor β -chain gene: chromosomal localization and identification of 5' regulatory sequences. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87, 3440-3444.

Guzmán C (2004). Citocinas y otras moléculas involucradas en sepsis y en pacientes con sepsis y en pacientes con neutropenia. *Alergia, asma e inmunología pediátrica*, 13(1):15-23.

Hainaut P and Hollstein M (2000). p53 and human cancer: the first ten thousand mutations. *Adv Cancer Res* 77: 81-137.

Hanahan D and Weinberg RA (2011). The hallmarks of cáncer: The next generation. *Cell* 144: 646-674.

Hengartner M 2000 The biochemistry of apoptosis. *Nature*;407:770-776.

Herceg Z and Hainaut P (2007). Genetic and epigenetic alterations as biomarkers for cancer detection, diagnosis and prognosis. *Molecular Oncology* 1: 26-41.

IARC (2007). IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, Volume 90, Human papillomaviruses. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer.

Jian-Xin L and Warren J (1997). Signaling from the IL-2 Receptor to the Nucleus *Cytokine & Growth Factor Reviews* Vol. 8, No. 4, pp. 313-332.

Johnson K, Choi Y, Wu Z, Ciardelli T, Granzow R, Whalen C, Sana T, Pardee G, Smith K, and Creasy A (1994). Soluble IL2 receptor beta and gamma subunits: ligand binding and cooperativity. *Eur Cytokine Netw*, 5:23-34.

Kawahara A, Minami Y and Taniguchi T (1994). Evidence for a critical role for the cytoplasmic region of the interleukin 2 (IL-2) receptor γ chain in IL-2, IL-4, and IL-7 signalling. *Mol Cell Biol*, 14, 5433-5440.

Krieser R and White K (2002). Engulfment mechanism of apoptotic cells. *Curr Opin Cell Biol* 14: 734-738.

Kroemer G, Zamzami N, Susin S (1997). Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol today*;18:44-51.

Leonard W, Depper, J, Crabtree G, Rudikoff S, Pumphrey J, Robb R, Kronke M, Svetlik P, Peffer N, Waldmann T, and Green W (1984). Molecular cloning and expression of cDNAs for the human interleukin-2 receptor. *Nature*, 311,626 631.

Leonard W, Donlon T, Lebo R, and Greene W (1985). Localization of the germ encoding the human interleukin-2 receptor on chromosome 10. *Science*, 228, 1547 1549.

Lobrich M and Jeggo PA (2007). The impact of a negligent G2/M checkpoint on genomic instability and cancer induction. *Nat Rev Cancer* 7: 861-869.

Loeb LA, Bielas JH, Beckman RA (2008). Cancers exhibit a mutator phenotype: clinical implications. *Cancer Res* 68:3551-3557.

Logue S and Martin S (2008). Caspase activation cascades in apoptosis. *Biochem Soc Trans* 36: 1-9.

López S y Lizano S. (2006). Cáncer cérvicouterino y el virus del papiloma humano: La historia que no termina. *Cancerologia* 1: 31-55

López-Casillas F. (2002). El ciclo celular bien vale un galardón. *Ciencia* enero-marzo: 74-77.

Matsuyama S, Llopis J, Deveraux Q (2000). Changes in intramitochondrial and cytosolic pH: early events that modulate caspase activation during apoptosis. *Nat Cell Biol* 2: 318-325.

Merlo LM, Pepper JW, Reid BJ, et al. (2006). Cancer as an evolutionary and ecological process. *Nat Rev Cancer* 6:924-935.

Minami Y, Kono T, Miyazaki T, Taniguchi T (1993). The IL-2 receptor. complex: its structure, function, and target genes. *Annu Rev Immunol*, 11:245-267.

Minami Y, Oishi L, Liu Z, Nakagawa S, Miyazaki T and Taniguchi T (1994). Signal transduction mediated by the reconstituted IL-2 receptor. Evidence for a cell type specific function of IL-2 receptor β -chain. *J Immunol*, 152, 5680-5690.

Mindiola R, Caulejas D, Núñez-Troconis J, Araujo M, Delgado M, Mosquera J (2008). Increased number of IL-2, IL-2 receptor and IL-10 positive cells in premalignant lesions of the cervix. *Invest Clin*. 49(4):533-45.

Mire S y Thorpe, R (1998). *Cytokines*. Academic Press Great Britain, 19-33.

Mizel SB (1989). The interleukins. *FASEB J*. 3(12):2379-88.

Mori R, Wang Q, Danenberg KD, Pinski JK, Danenberg PV (2008). Both beta-actin and GAPDH are useful reference genes for normalization of quantitative RT-PCR in human FFPE tissue samples of prostate cancer. *Prostate*. 68(14):1555-60.

Morgan D, Ruscetti F and Gallo R (1976). Selective *in vitro* growth of T lymphocytes from normal human bone marrow. *Science*, 193, 1007-1008.

Munoz N, Bosch F, de Sanjose S, et al. (2003). Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 348: 518-527.

Nagata S (1999). Fas Ligand-induced apoptosis. *Annu Rev genet*, 33:29-55.

Nelson B, Lord J and Greenberg P (1994). Cytoplasmic domains of the interleukin-2 receptor β and γ chains mediate the signal for T-cell proliferation. *Nature*, 369:333-336.

Olivier M, Petitjean A, Marcel V (2008). Recent advances in p53 research: an interdisciplinary perspective. *Cancer Gene Ther Advance* online publication 19 September. DOI:10.1038/cgt.2008.69.

Page T and Dallman, M (1991). Molecular cloning of cDNAs for the rat interleukin 2 receptor α and β chain genes: differentially regulated gene activity in response to mitogenic stimulation. *Eur J Immunol*, 21, 2133-2138.

Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J, (2008). Cancer incidence in five continents, vol VII. International Agency for Research on Cancer, Scientific Publications number 143. Lyon; IARC.

Ramírez A (1997). Inmunología básica y clínica. Editorial Manual Moderno México.

Riedl S and Salvesen G (2007). The apoptosome: signaling platform of cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 405-413

Rangel-Corona R, Corona-Ortega T, Soto-Cruz I, López-Labra A, Pablo-Arcos T, Torres-Guarneros CF, Weiss-Steider B (2010). Evidence that cervical cancer cells secrete IL-2, which becomes an autocrine growth factor. *Cytokine*. 50(3):273-7.

Rangel-Corona, Rodríguez C, Flores F, Gómez R, Soto C, Mendoza R y Weiss S. Differential expression of the two components of the Interleukin-2 receptor in cervical cancer cells. *Monduzzie Editors* 1998, 3:1239-1243.

Robb R, Greene W and Rusk C (1984). Low and high affinity cellular receptors for interleukin 2. Implications for the level of Tac antigen. *J Exp Med*, 160, 1126-1146.

Rocha Z, Ambrosio P, Mora G, Cruz T, Hernandez M, Weiss S, Ortiz N y Monroy G (2004). Detection of antibodies against a human papillomavirus (HPV) type 16 peptide that differentiate high-risk from low-risk HPV-associated low-grade squamous intraepithelial lesions. *Journal of General Virology*, 85:2643-2650.

Romo de Vivar Chavez A, de Vera M, Liang X, Lotze M (2009) The biology of interleukin-2 efficacy in the treatment of patients with renal cell carcinoma. *Med Oncol*. 26 Suppl 1:3-12.

Saito Y, Tada H, Sabe H and Honjo T (1991). Biochemical evidence for a third chain of the interleukin-2 receptor. *J Biol Chem*, 266, 22186-22191.

1 Scheffner M, Münger K (1991) The state of the p53 and retinoblastoma genes in human cervical carcinoma cell lines. *Proc. Acad. Sci.* 88:5523-5527

Smith K (1989). The interleukin 2 receptor. *Annu Rev Cell Biol.* 5, 397-425.

Stark GR and Taylor WR (2006). Control of the G2/M transition. *Mol Biotechnol* 32: 227-248.

Strasser A, O'Connor L, Dixit VM (2000). Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem* 69: 217-2

Takeshita T, Asao H, Ohtani K, Ishii N, Kumaki S, Tanaka N, Muuakata H, Nakamura M and Suga K (1992). Cloning of the 5' chain of the interleukin-2 receptor. *Science*, 257, 379-382.

Teshigawara K, Wang H, Kato K and Smith K (1987). Interleukin 2 high-affinity receptor expression requires two distinct binding proteins. *J Exp Med*, 165, 223-238.

Tsuda M, Kitamura F and Miyasaka M (1989). Characterization of the interleukin 2 receptor β chain using three distinct monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86, 1982-1986.

VanderSpek C, Sutherland J, Ratnarathorn M, Howland K, Ciardelli L, and Murphy R (1996). Interleukin-2 Receptor Binding Domain Mutations. *Biological Chemistry*, 271 (2):12145-1249.

Walboomers JMM, Jacobs MV, Manos MM. (1999). Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *Pathol J*, 189: 12-19.

Waldmann, T A (1989). The multi-subunit interleukin-2 receptor. *Annu Rev Biochem*, 58, 875-911.

Yee C, Krishnan H, Baker C, Schlegel R y Lyons R (1985). Presence and expression of human papillomavirus sequences in human cervical carcinoma cell lines. *American Journal of Pathology* , 119, 3261-3266.

Youfen Li, Jeong Soon Park, JianHong Deng, and Yidong Bai (2006). Cytochrome c Oxidase Subunit IV is Essential for Assembly and Respiratory Function of the Enzyme Complex J. *Bioenerg Biomembr.* 38(56): 283–291

13. ANEXOS

APENDICE 1

Condiciones utilizadas en la técnica RT-PCR

a. Retrotranscripción:

Para el presente estudio se partió de 2 µg de ARN total para todas las muestras (controles y tratamientos). Para lo cual se utilizó la siguiente fórmula:

Absorbancia 260: Lectura dada por cada muestra en el biofotómetro.

Volumen de disolución: Se utilizó una disolución de 1:50 en un volumen de 200 µl.

40: Unidad de densidad óptica (1 UDO) equivale a 40 µg/ml del biofotómetro.

$$\frac{(\text{Absorbancia 260}) (\text{Volumen de la disolución}) (40)}{1000} = 12\mu\text{G}/\mu\text{l}$$

Teniendo los cálculos de todas las muestras y partiendo de 2 µg de ARNm se prosiguió a realizar la RT con las siguientes condiciones establecidas para una reacción (Rx), (Tabla 1). Cada una de las condiciones por reactivo se multiplicó por el número total de reacciones que se quisieron obtener (5 controles y 5 tratamientos).

| Reactivos | 1 RX | 5 RX controles | 5 RX estímulos |
|--|--------|----------------|----------------|
| Amortiguador 5x ^(PROMEGA) | 5 µl | 25 µl | 25 µl |
| DNTP's 10 Mm ^(INVITROGEN) | 1.5 µl | 7.5 µl | 7.5 µl |
| Enzima MMLVRT ^(PROMEGA) | 1 µl | 5 µl | 5 µl |
| Oligo dt ^(PROMEGA) | 2 µl | 10 µl | 10 µl |
| Muestra | ¿? µl | ¿? µl | ¿? µl |
| Agua libre RNAsas ^(FERMENTAS) | ¿? µl | ¿? µl | ¿? µl |
| Volumen Total | 20 µl | 200 µl | 200 µl |

Tabla 1. Condiciones para RT

b. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Con los ADNc obtenidos de la RT se llevó a cabo la PCR utilizando las condiciones establecidas para 1 Rx, las cuales se multiplicaron por el número de reacciones que se requieren (tabla 2), para cada primer utilizado en el presente estudio (β -actina, cadena α , β y γ de IL-2 y citocromo c).

| Reactivos | 1 RX | 10 RX |
|---|-------------------------------|-------------------------------|
| Amortiguador 5x Green ^(PROMEGA) | 6 μl | 60 μl |
| DNTP's 10 Mm ^(INVITROGEN) | 0.8 μl | 8 μl |
| Primer 1 (Sentido) ^(UNIPARS) | 1 μl | 10 μl |
| Primer 2 (Antisentido) ^(UNIPARS) | 1 μl | 10 μl |
| GoTaq Polimerasa ^(PROMEGA) | 0.15 μl | 1.5 μl |
| Muestra ADNc | 4 μl | 4 μl |
| Agua libre RNAsas ^(FERMENTAS) | 7.05 μl | 70.5 μl |
| Volumen Total | 20 μl | 200 μl |

Tabla 2. Condiciones para cada reacción en la técnica PCR.

APENDICE 2

Reactivos y soluciones utilizados

Soluciones para cultivo

- RPMI-1640/10 % SFB
- Solución fisiológica de verseno
- Amortiguador salino de fosfatos (PBS)

Reactivos extracción ARN Total

- Trizol ^(INVITROGEN)
- Cloroformo
- Isopropanol
- Etanol 70 %
- Agua inyectable
- Agua libre de RNAsas

Reactivos Retrotranscripción (RT)

- Amortiguador 5X ^(PROMEGA)
- Enzima MMLVRT ^(PROMEGA)
- DNTP's 10 Mm ^(INVITROGEN)
- Oligo dt ^(PROMEGA)
- Agua libre de RNAsas ^(FERMENTAS)

Reactivos Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

- Amortiguador 5x Green ^(PROMEGA)
- DNTP's 10 Mm ^(INVITROGEN)
- Enzima GoTaq Polimerasa ^(PROMEGA)

-
- Primers: β -actina, cadena α , β y γ de IL-2 y citocromo c
 - Agua libre RNAsas ^(FERMENTAS)

Reactivos y soluciones para electroforesis

- Agarosa ^(INVITROGEN)
- TBE 10X, 1X, 0.5X
- Gel de agarosa al 1.5%
- Marcador de peso molecular
- Buffer de carga blue/yellow 6X ^(PROMEGA)
- Bromuro de etidio

APENDICE 3

Preparación de reactivos y soluciones

Desactivación del Suero Fetal Bovino (SFB)

El SFB ^(GIBCO) se deja descongelar a temperatura ambiente, una vez descongelado, se pasa a un baño de agua a 57 °C durante 30 min. Esto se hace para inactivar proteínas de bajo peso molecular que pueden interferir con el crecimiento celular.

Solución fisiológica de Verseno

Esta solución se emplea para despegar las células tumorales adherentes y funciona como agente quelante que atrapa iones de calcio y magnesio de las uniones celulares. Para su preparación.

| | |
|--------------------------------------|------------------------------------|
| — Tris base | 3.04 g ^(SIGMA CHEMICAL) |
| — Cloruro de sodio | 8.00 g ^(SIGMA CHEMICAL) |
| — Cloruro de potasio | 0.04 g ^(SIGMA CHEMICAL) |
| — Etilen-diamen-tetra acético (EDTA) | 0.40 g ^(SIGMA CHEMICAL) |

Los reactivos se disuelven en 800 ml de agua bidestilada, que ajusta al pH a 7.7 con HCL 1M y se afora a 1000 ml de agua bidestilada. La solución se esteriliza por medio de autoclave a 20 Ibs durante 20 min.

Solución Amortiguadora de Fosfatos (PBS)

Se utiliza para mantener a las células en condiciones fisiológicas estables durante periodos cortos. La capacidad amortiguadora es proporcionada por las sales de fosfato. Los componentes se diluyen en un volumen final de 1 litro de agua bidestilada.

| | |
|-----------------------|------------------------------------|
| — Cloruro de magnesio | 0.10 g ^(SIGMA CHEMICAL) |
| — Cloruro de sodio | 8.00 g ^(SIGMA CHEMICAL) |

| | |
|------------------------------|-------------------------|
| — Cloruro de potasio | 0.20 g (SIGMA CHEMICAL) |
| — Cloruro de calcio | 0.10 g (SIGMA CHEMICAL) |
| — Fosfato monoácido de sodio | 2.16 g (SIGMA CHEMICAL) |
| — Fosfato diácido de potasio | 0.20 g (SIGMA CHEMICAL) |

El cloruro de magnesio y de calcio se disuelven en 100 ml de agua bidestilada y después se adicionan. Se ajusta el pH a 7.2 – 7.4 utilizando HCl 8N y se afora finalmente a un volumen de 1000 ml. Esta solución se esteriliza por medio de autoclave a 20 lbs durante 20 min, la solución se almacena a 4°C hasta el momento de uso.

DNTPs 10 mM (MIX)

Todos los nucleótidos se encuentran a una concentración de 100 mM, de los cuales se toman las siguientes cantidades:

| | |
|-----|--------------------------|
| — A | 100 μ L (INVITROGEN) |
| — G | 100 μ L (INVITROGEN) |
| — T | 100 μ L (INVITROGEN) |
| — C | 100 μ L (INVITROGEN) |

Estos se diluyen en 600 μ L de agua libre de RNAsas para obtener 1 mL a una concentración de 10 mM.

TBE 10X

| | |
|----------------|------------------------|
| — Tris base | 108 g (SIGMA CHEMICAL) |
| — Ácido bórico | 55 g (SIGMA CHEMICAL) |
| — EDTA 0.5 M | 40 mL (SIGMA CHEMICAL) |

Se lleva a 1000 mL con agua destilada, si hay precipitaciones debe descartarlas. Se almacena a temperatura ambiente hasta su uso.

TBE 1X

Tomar 50 mL de TBE 10X y diluirlo en 450 mL de agua destilada.

TBE 0.5X

Tomar 250 mL de TBE 1X y diluirlo en 250 mL de agua destilada.